

THÈSES
présentées à
la FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS
pour l'obtention du titre
de DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ
de PARIS
(mention Sciences)

par Mademoiselle PERAUDEAU Lucette

Sujet de la 1^{re} Thèse : Étude de la replication du virus
leucémogène murin de Rauscher dans une lignée
cellulaire chroniquement infectée par ce virus.

Sujet de la 2^e Thèse : Les besoins quantitatifs en
asparagine de la cellule normale et cancéreuse :
mécanisme d'action de l'asparaginase.

Soutenues le 16 Juin 1969 devant la Commission

composée de :

Président	:	A. THOMAS
Examineurs	:	A. HOLLANDE
		P. CARTIER
		J. BERNARD
		M. BOIRON

THÈSES

présentées à

la FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

pour obtenir le titre

de DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

par Mademoiselle PERAUDEAU Lucette

Sujet de la 1^{re} Thèse : Étude de la replication du virus leucémogène murin de Rauscher dans une lignée cellulaire chroniquement infectée par ce virus.

Sujet de la 2^e Thèse (propositions données par la Faculté) :
Les besoins quantitatifs en asparagine des cellules normales et cancéreuses : mécanisme d'action de l'asparaginase.

Soutenues le 16 Juin 1969 devant la Commission

composée de :	Président :	A. THOMAS
	Examineurs :	A. HOLLANDE P. CARTIER J. BERNARD
	Invité :	M. BOIRON

THÈSES

présentées à

LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

pour obtenir le titre

de DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

par MATHÉMOISELLE FERRAUDO INCESTE

Sujet de la 1^{re} Thèse : Étude de la répartition des virus leucémogènes
dans le Raton, dans une lignée cellulaire chimiquement
infectée par ce virus.

Sujet de la 2^e Thèse (proposition donnée par la Faculté) :
Les besoins quantitatifs de l'organisme des cellules normales et
mutées : action de l'azote.



Examinées le 10 juin 1965 devant la Commission

présentée de :
Président : A. GOMM
Rapporteurs : W. HOLSTADT
F. C. LEBLANC
J. M. LEBLANC
J. M. LEBLANC

A Monsieur le Professeur André THOMAS qui nous fait l'honneur de
présider cette Thèse,

A Monsieur le Professeur Jean BERNARD, en témoignage de notre
profonde et respectueuse reconnaissance,

A Messieurs les Professeurs André HOLLANDE et Pierre CARTIER qui
ont bien voulu accepter d'être membres de notre Jury,

A Monsieur le Professeur Michel BOIRON, sans lequel notre travail
n'aurait pas été possible et qui nous a toujours guidé avec
beaucoup de bienveillance,

A Messieurs Francis GALIBERT, Bernard GUILLEMAIN, Armand TAVITIAN
qui nous ont tout particulièrement aidé de leurs conseils,

A tous les membres du Laboratoire d'Hématologie Expérimentale de
l'Hopital Saint-Louis,

A mes Parents.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552226_0006

ABBREVIATIONS UTILISEES

RNA	Acide ribonucléique
RNase	Ribonucléase
A,U,C,G	Nucléosides constitués à partir des bases suivantes : adénine, uridine, cytosine, guanine.
SSC	Saline sodium citrate (0,15 M Na Cl - 0,015 M citrate trisodique
UV	Ultraviolets
DO	Densité optique
CPM	Coups par minute en radioactivité
Tris	Tris-(hydroxyméthyl)-amino-méthane
TCA	Acide trichloracétique
EDTA	Acide éthylène diamine tétracétique - sel disodique
SDS	Dodécyl-sulfate de sodium
PVS	Polivinyl sulfate de Potassium
RSB	Reticulocytes suspension Buffer (Tris 10^{-2} M, Na Cl 10^{-2} M, Mg Cl ₂ 15.10^{-4} M
HSB	High salt Buffer (Na Cl 5.10^{-1} M, Mg Cl ₂ 5.10^{-2} M, Tris 10^{-2} M)..
S	Coefficient de sédimentation
KOH	Potasse
Na Cl	Chlorure de sodium
Mg Cl ₂	Chlorure de Magnesium
³ H	Tritium
³² P	Phosphore radioactif
GMP	Acide guanilique monophosphorique 3'
CMP	Acide cytidilique monophosphorique 3'
AMP	Acide adénylique monophosphorique 3'
UMP	Acide uridilique monophosphorique 3'
η	Viscosité
Am D	Actinomycine D
Γ	Force ionique
DNase	Désoxyribonucléase
DNA	Acide désoxyribonucléique

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION ET HISTORIQUE

PLAN DETAILLE

CHAPITRE I : Généralités sur la lignée JLS V5 et sur le RNA du virus de Rauscher.

CHAPITRE II : Réplication virale suivie par l'incorporation de traceurs dans le RNA des virions extracellulaires.

CHAPITRE III : Réplication virale suivie par l'incorporation des traceurs dans le RNA viral intracellulaire.

CHAPITRE IV : Discussion sur les modalités de replication du RNA des virus leucémogènes.

ETUDE DE LA REPLICATION DU VIRUS LEUCÉMOGÈNE MURIN DE RAUSCHER DANS
UNE LIGNEE CELLULAIRE CHRONIQUEMENT INFECTÉE PAR CE VIRUS.

INTRODUCTION

Les leucémies murines sont encore avec l'exception de la leucémie du chat récemment décrite (Jarrett, W.F.H., 1967) les seules leucémies de mammifères pour lesquelles une étiologie virale a été nettement établie. Cette propriété en fait le modèle principal des recherches sur l'étiologie et la compréhension des leucémies de mammifères supérieurs et de l'homme.

Gross en 1951 isole un agent infectieux transmissible par filtrats acellulaires, présent dans les tissus de souris AKR spontanément leucémiques et capables de provoquer une leucémie chez les récepteurs de souches C3H à faible incidence de leucémies spontanées. Pendant les 7 années qui suivirent cette découverte, l'étude des virus des leucémies murines n'a pu être poursuivie qu'in vivo par passage de filtrats d'organes ou d'échantillons de sang leucémique.

Les plus étudiés pendant cette période sont le virus de Schwartz (1955) isolé au cours d'une leucémie spontanée de souris Swiss, celui de Friend (1957) isolé dans le carcinome d'Erlich et qui provoque chez la souris Swiss DBA/2 une hémopathie érythroréticulaire, celui de Graffi (1960) retrouvé dans diverses tumeurs transplantables et qui provoque très régulièrement une leucémie myéloïde ou parfois lymphoïde dans diverses souches, celui de Moloney (1960), qui isolé du sarcome 37 provoque chez de nombreuses souches de souris une leucémie lymphoblastique. Enfin en 1962, Rauscher travaillant initialement sur le virus de Schwartz isole une nouvelle souche de virus leucémique (donnant une hémopathie maligne très particulière) et qui porte désormais le nom de virus de Rauscher.

Durant cette même période, en 1958 Moore et Friend puis Manaker et Col. (1960) et enfin Gross et Col. (1961) réussissaient à multiplier les virus des leucémies murines en culture de tissus. Ce fut une étape très importante qui pouvait permettre des progrès rapides et importants dans l'étude de ces virus et de leurs interactions avec l'hôte cellulaire.

Mais ce n'est toutefois qu'en 1964 que Manaker d'une part, Wright et Lasfargues d'autre part, et enfin Périès et Col. (1964) sur cellules rénales de souris, réussissent à adapter certains virus leucémiques à des lignées cellulaires continues avec production massive de ces virus.

Par ailleurs, l'étude in vitro de virus des leucémies murines fut longtemps rendue difficile par le nombre limité des marqueurs permettant de détecter ces virus dans les cultures et plus particulièrement par l'absence d'effet cytopathogène, de transformation des cellules in vitro, d'hémadsorption et d'héماغglutination et d'une activité enzymatique associée au virus.

Disposant d'une lignée établie par Wright et Lasfargues (1965) et produisant de façon continue le virus de Rauscher en grande quantité, il a été possible d'étudier l'acide ribonucléique de ce virus dont les caractéristiques pouvaient constituer ultérieurement un marqueur de virus.

Plusieurs équipes se sont attaquées à ces problèmes biochimiques et en particulier, dans notre laboratoire, Galibert et Col. (1965) et aux Etats-Unis Duesberg et Col. (1966).

L'isolement et la caractérisation du RNA extrait du virus de Rauscher, la démonstration qu'il s'agit d'un RNA monochaine de haut poids moléculaire, devaient naturellement conduire à se poser la question de la réplication de ce RNA. Il ne s'agit d'ailleurs pas d'un problème limité au virus de Rauscher puisque Robinson et Duesberg, entre autres, ont bien démontré que tous les virus

leucémogènes et sarcomatogènes, soit aviaires, soit murins, possédaient un RNA de mêmes caractéristiques. On peut donc supposer que le mode de réplication de ces virus est identique. Malgré les travaux systématiques de différentes équipes, tant françaises qu'étrangères, le mode de réplication du RNA des virus leucémogènes n'est pas encore parfaitement établi.

Nous avons tenté d'étudier cette réplication en utilisant pour matériel, une souche cellulaire (JLS V5) chroniquement infectée par le virus de Rauscher et cette Thèse s'inscrit comme une contribution à l'étude de ce problème dont l'importance est évidente pour la compréhension de la leucémogénèse.

PLAN

Dans ce travail, nous isolerons 4 grands chapitres :

I - GENERALITES

A - SUR LA LIGNEE JLS V5

- . création de la lignée
- . caractères cytologiques
- . le virus produit
- . l'équilibre cellules-virus

B - SUR LE RNA DU VIRUS DE RAUSCHER

- . extraction, après purification, par la méthode au phénol
- . constante de sédimentation
 - variation de la constante de sédimentation en
 - fonction de la force ionique
- . composition en bases

II - REPLICATION VIRALE SUIVIE PAR L'INCORPORATION DE TRACEUR DANS LE RNA DES VIRIONS EXTRACELLULAIRES

Méthodes - extraction au sodium-dodecyl-sulfate

Courbes d'incorporation normales (verre + plastique)

Production virale et multiplication cellulaire

Action de l'Actinomycine D

III - REPLICATION VIRALE SUIVIE PAR L'INCORPORATION DES TRACEURS
DANS LE RNA VIRAL INTRACELLULAIRE

Méthodes - extraction à partir des cellules entières

- extraction à partir du cytoplasme

nucléoplasme

nucléoles

Individualisation d'un pic viral intracellulaire

Localisation intracellulaire du RNA viral

Effet de l'Actinomycine D

IV - DISCUSSION SUR LES MODALITES DE REPLICATION DU RNA DES
VIRUS LEUCEMOGENES

CHAPITRE I

GENERALITES

L'étude du RNA du virus de Rauscher et de sa réplication nécessite le choix d'un système biologique convenable qui produise le virus.

Il est possible d'extraire le virus de Rauscher en grande quantité du plasma de souris leucémiques ; par contre l'étude de la réplication du RNA viral serait extrêmement délicate à étudier "in vivo". C'est pourquoi, il convient de s'adresser à des systèmes cellulaires produisant le virus "in vitro". Parmi ceux-ci, nous avons choisi la lignée cellulaire JLS V5.

A - GENERALITES SUR LA LIGNEE JLS V5

Les systèmes cellulaires qui produisent "in vitro" le virus de Rauscher sont de différents types. On peut tout d'abord explanter des cellules leucémiques ou des cellules provenant d'organes (rein) de souris leucémiques ou préleucémiques. Ces cellules produisent le virus de Rauscher, mais il est difficile de leur faire subir des passages répétés. Une deuxième solution est d'infecter, avec du virus de Rauscher provenant de plasma de souris leucémiques, des monocouches de cellules de souris normales (fibroblastes embryonnaires, cellules rénales etc...). Outre que l'infection des cellules peut être assez difficile, les cultures ne se maintiennent généralement pas. C'est pourquoi la mise au point par Wright et Lasfargues (1964) d'une lignée cellulaire continue (JLS V6) provenant à l'origine de cellules thymiques et spléniques normales de souris BALB/c, infectable facilement par le virus de Rauscher, et produisant dès lors continuellement le virus, a été un grand progrès dans l'étude du virus de Rauscher in vitro.

a) Caractéristiques générales

La lignée JLS V5 provient à l'origine de cellules JLS V6 infectées par le virus de Rauscher au 6^{ème} passage de cette culture : JLS V5 et JLS V6 ont depuis 1964 été entretenues dans plusieurs laboratoires, dont le nôtre. JLS V6 est, comme on le voit, la lignée contrôle, non infectée ; en fait, les cellules JLS V6 produisent de petites quantités d'un virus semblable au virus de Rauscher, mais dépourvu de pouvoir leucémogène.

Les cellules JLS V5 poussent facilement sur verre ou plastique, en formant des monocouches, dans les milieux de culture usuels (Hydrolysate de caséine, Eagle, etc...). Leur aspect est de type fibroblastique. Le temps de génération est d'environ 24 heures. Comme la très grande majorité des cellules de lignée continue chez la souris, les cellules JLS V5 sont néoplasiques : elles provoquent des tumeurs locales chez la souris et l'étude chromosomique démontre une polyploïdie franche. L'étude cytologique de ces cellules révèle un noyau volumineux, des nucléoles nombreux. Il n'existe pas d'inclusions de type viral dans le noyau ou le cytoplasme (Bernard, C. et Col. 1965).

b) Production du virus de Rauscher

Ces cellules produisent de façon continue le virus de Rauscher comme on peut s'en assurer par les faits suivants :

- le surnageant de culture, concentré 100 fois par ultracentrifugation à 56.000 g est leucémogène pour la souris BALB/c et Swiss. La leucémie réalisée est de type Rauscher.

- le même surnageant concentré 100 fois et examiné au microscope électronique après coloration négative par l'acide phosphotungstique (Brener et Horne, 1959), contient de très nombreuses particules virales identiques à celles trouvées dans le plasma et les organes de souris leucémiques.

Du fait de la dessiccation sur la grille en milieu hypertonique, les particules prennent un aspect caudé caractéristique (figure 1) par diffusion d'eau hors du virion. Par contre, si le culot viral provenant du surnageant de culture est préalablement fixé par l'osmium, les virions sont sphériques (figure 2) d'un diamètre global de 100 m μ environ et se composent d'une enveloppe externe assez épaisse et d'un nucléoïde dense de 50 m μ de diamètre environ.

Il existe entre le nucléoïde et l'enveloppe un espace amorphe. Le nucléoïde contient le RNA viral associé à des protéines (parmi lesquelles l'antigène de groupe "leucémies murines"). L'enveloppe contient des protéines virales (parmi lesquelles les antigènes de type), des enzymes, des protéines structurales et des lipides d'origine cellulaire.

- l'examen au microscope électronique des cellules JLS V5, après fixation par l'osmium, inclusion dans l'araldite et coupes ultrafines, confirme que les cellules produisent de très nombreux virions de type "leucémique". On peut voir en particulier les virions sortir de la cellules par "bourgeonnement". Ceci permet de comprendre pourquoi l'enveloppe externe du virion contient des composants (protéines et lipides) de la membrane cellulaire (Silvestre, D. et Col. 1965).

Les particules virales sont retrouvées dans le milieu extra cellulaire et en voie de bourgeonnement à partir de la membrane cytoplasmique. On ne voit jamais de virions dans le cytoplasme. Il en existe toutefois dans les vacuoles (figure 3).

- cette production virale est extrêmement intense. En effectuant des numérations au microscope électronique, Lévy (1966) a pu montrer, dans notre laboratoire, que le surnageant de culture JLS V5 contenait en moyenne 10^9 virions par ml et que chaque cellule produisait plusieurs centaines de virions par heure.

Le virus de Rauscher produit est identique à celui extrait de plasma de souris leucémiques. Une seule différence cependant,

FIGURE 1 : Virus de Rauscher extrait des surnageants de culture JLS V5 le 2ème jour de la mise en culture des cellules ; après purification, coloration par contraste négatif ; 8.000 X 2,5.
Particules caudées dues à l'hypertonie de l'acide phosphotungstique.

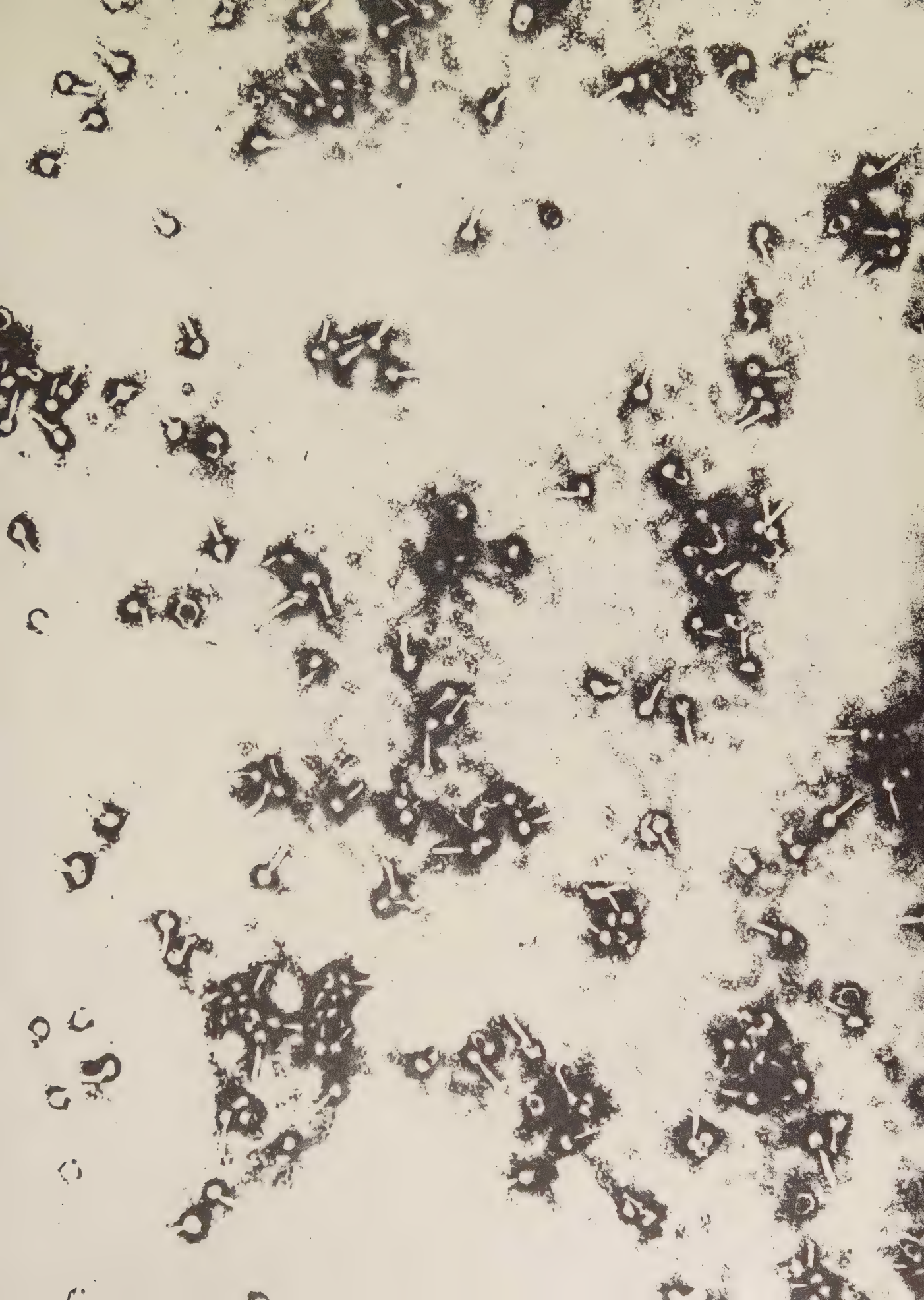
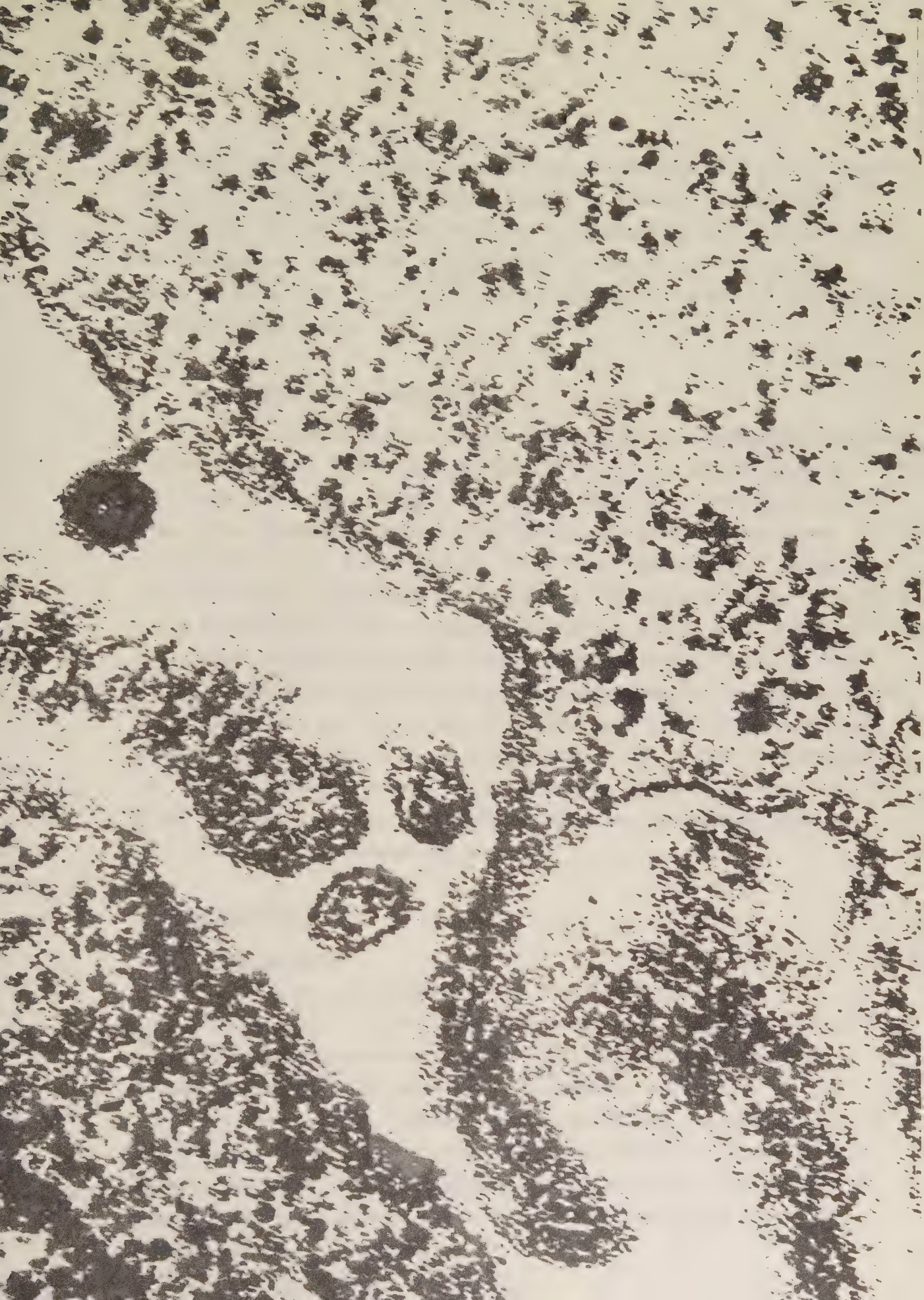




FIGURE 3 : Cellules JLS V5 au 6ème jour de culture, fixation par la glutaraldéhyde et l'acide osmique 1 % en tampon phosphate ; coloration par l'acétate d'uranyle et le plomb ; 17.000 X 2,5.

Particules virales typiques au contact d'une cellule qui produit activement le virus, et présence de bourgeonnements viraux.



mais importante, est à noter : le pouvoir leucémogène du virus de culture est 1.000 fois inférieur à celui du virus de plasma. Il faut 10^6 particules environ provenant du plasma pour réaliser une "dose efficace 50" (calculée à partir de la splénomégalie induite in vivo par le virus de Rauscher). Pour la même dose efficace, il faut 10^9 particules provenant de cultures.

c) Interaction cellules-virus

Les études de microscopie électronique et d'immunofluorescence faites dans notre laboratoire ont montré que toutes les cellules de la lignée JLS V5 produisaient le virus de Rauscher. Cette production n'entraîne apparemment aucune modification des grands métabolismes cellulaires. Il y a donc un état d'équilibre "steady-state" entre la prolifération cellulaire et la synthèse des virions. Aucun interféron n'est retrouvé dans les surnageants de culture. Ce système d'interactions cellules-virus diffère de celui décrit comme "carrier-state" où seul un petit nombre de cellules assurent la permanence de l'infection virale chronique, alors que les autres produisent de l'interféron. L'absence d'effet cytopathogène, soit de type lytique, soit de type transformant, est une des caractéristiques fondamentales du système cellulaire JLS V5. C'est d'ailleurs pourquoi ces cultures réalisent un système idéal et au long cours de production virale.

B - RNA RAUSCHER

Source du virus

Elle est représentée par la lignée JLS V5.

Afin de réduire les quantités de virus à préparer pour extraire le RNA, nous avons sensibilisé la détection du RNA viral à l'aide d'un marquage de ce dernier au phosphore radioactif ^{32}P .

Pour cela, on ajoute au milieu de culture, en général $5\mu\text{c/ml}$ de ^{32}P sous forme de $\text{PO}_4 \text{ H}_3$. De plus, pour améliorer l'incorporation dans le RNA viral, le tampon phosphate habituellement utilisé pour préparer le milieu de culture est remplacé par un tampon Tris (Tris-hydroxy-méthyl-amino-méthane).

Culture des cellules JLS V5

Environ 5×10^6 cellules JLS V5 sont ensemencées par boîtes de Roux de 1 litre avec 100 ml de milieu de marquage tampon Tris, contenant des doses de 5 à $10 \mu\text{c/ml}$ de ^{32}P .

Après 2 ou 3 jours, la monocouche cellulaire est continue, le milieu de culture est alors récupéré. Il contient le virus libéré par les cellules. Celui-ci est purifié par la méthode de Moloney (Moloney, 1962) des quelques cellules intactes et débris cellulaires flottant dans le surnageant de culture.

La méthode de Moloney consiste en une série de centrifugations à basse vitesse destinées à éliminer les aggrégats et les débris cellulaires présents dans le surnageant, puis, à l'aide d'une centrifugation à haute vitesse à sédimenter et récolter le virus sous forme de culot.

Les surnageants sont centrifugés pendant 15 mn à 1.200 g. Le surnageant de centrifugation est doucement décanté à la pipette puis recentrifugé 15 mn à 1.200 g puis de nouveau décanté avec précaution pour éviter de resuspendre les débris cellulaires. Une courte centrifugation de 2 mn à 10.000 g permet de parfaire la purification mais n'est nécessaire que pour l'examen au microscope électronique.

Le virus est alors sédimenté par ul'racentrifugation pendant 1 heure à 56.000 g (21.000 rpm dans le rotor 21 de l'ultra-centrifugeuse Spinco).

Après centrifugation, le surnageant est éliminé par retournement du tube et égouttage sur papier filtre.

On peut alors observer un petit culot plus ou moins translucide de virus adhérant au fond du tube. Toutes ces opérations sont faites à $+ 4^\circ\text{C}$.

Le culot viral est alors remis en suspension, généralement directement dans le tampon d'extraction. Pour cela, on ajoute 2 ml de tampon acétate (acétate de sodium 0,02 M pH 5). On décroche le culot avec un homogénéiseur de Thomas en téflon et on homogénéise directement dans le tube pour parfaire la suspension du virus.

Extraction du RNA viral

L'étude des acides nucléiques n'a été valablement entreprise que depuis une dizaine d'années. En fait, l'acquisition de connaissances nouvelles a été pendant longtemps limitée par les possibilités de préparation des acides nucléiques dans un état macro-moléculaire satisfaisant.

De nombreuses méthodes d'extraction ont été préconisées. Ce sont, en fait, des adaptations individuelles de la technique originale de Gierer et Schramm (1956).

De toutes manières, si chaque expérimentateur finit par avoir sa recette, un certain nombre de précautions générales sont à prendre car il faut éviter les dégradations enzymatiques, mécaniques et les aggrégations des RNA macromoléculaires.

Il faut donc, avant toute chose, une vaisselle impeccable, débarrassée de toutes traces métalliques par un rinçage avec une solution d'EDTA au besoin ; il faut éviter de mettre les doigts sur les parties de la vaisselle devant être en contact avec les solutions pour se prémunir contre l'action des RN ases latentes ; il est préférable de préparer extemporanément les solutions d'extraction et d'employer du phénol fraîchement distillé, si possible sous pression réduite afin de le priver de traces de peroxydes et conservé à l'abri de la lumière et au froid tout au plus quelques jours.

Juste avant l'extraction du RNA, le phénol est réchauffé au bain marie et additionné du 1/10^e de son volume de tampon acétate.

Cette solution est refroidie à la température du laboratoire et conservée dans le noir pendant toute la durée de l'extraction.

Principe de l'extraction

Le matériel biologique soumis à l'extraction est homogénéisé dans un tampon de faible force molaire ($I/2 = 0,05$) et de pH compris entre 5 et 8. Les protéines du milieu sont alors dénaturées et éliminées par des traitements au phénol puis la solution est enfin débarrassée du phénol.

Dans ce travail, nous avons utilisé une technique inspirée tout à la fois de celle de Littauer et Eisenberg (1959), de Hiatt (1962) et de Scherrer et Darnell (1962). A la méthode de Littauer, nous avons emprunté la durée d'agitation (1 heure) en présence de phénol. Ce temps d'action est nécessaire à la destruction complète des ribonucléases, mais nous avons préféré fractionner ce temps en 3 périodes comme H. Hiatt.

De cette façon, après chaque traitement au phénol puis centrifugation, on élimine une partie des protéines déjà dégradées qui se rassemblent à l'interphase phénol-eau. Enfin, nous avons préféré utiliser le tampon d'extraction proposé par Scherrer car ayant un pH de 5 il nous a paru moins favorable à l'action de la ribonucléase. Par ailleurs, à ce pH le DNA n'est que très peu extrait et de ce fait, la solution ne devient jamais visqueuse, ce qui facilite beaucoup les manipulations ultérieures. Toutes ces manipulations se font à + 4° en chambre froide.

Cette technique nous a toujours donné entière satisfaction mais nous avons pris la précaution avant chaque extraction, de relaver la vaisselle nécessaire avec du SDS (sodium dodécyl sulfate), de la rincer abondamment à l'eau ordinaire, puis 3 fois à l'eau distillée et une fois avec la solution d'extraction, c'est-à-dire à l'acétate de sodium 0,02 M pH 5.

Protocole opératoire

La suspension virale obtenue après purification selon la technique de Moloney est diluée jusqu'à 18 ml dans du tampon acétate de sodium 0,02 M pH 5 et transvasé dans un erlenmeyer de 250 ml à bouchon rodé. Une solution de dodécyl sulfate de sodium (SDS purifié) à 4 % dans le même tampon ou l'eau distillée, est ajoutée en quantité suffisante pour avoir une concentration finale de 0,4 % soit 1,8 ml. Cette addition se fait doucement en agitant continuellement. Le SDS fait éclater les cellules d'une part et d'autre part rompt les liaisons acides nucléiques-protéines. De plus, il a une activité anti-RNasique.

Quelques secondes après l'addition du SDS, on ajoute du phénol à 90 % dans le tampon acétate, de volume égal à l'ensemble suspension virale et solution de SDS soit 20 ml. Le phénol est ajouté très doucement surtout au début, goutte à goutte, en agitant continuellement à la main pour permettre l'homogénéisation, qui doit être obtenue facilement.

La suspension blanchâtre qu'on obtient par addition du phénol est agitée pendant 30 mn au froid par agitation mécanique. L'agitation ne doit être ni trop forte ni trop douce. Trop douce, elle ne maintient pas la suspension et il y a séparation en 2 phases : une phase phénolique, une phase aqueuse. Trop forte, elle favorise les cassures mécaniques du RNA. Il faut donc agiter juste ce qu'il faut pour maintenir la suspension homogène.

Après 30 minutes, la suspension est centrifugée pendant 5 mn à 7.000 rpm dans une centrifugeuse de type MSE.

La centrifugation rompt l'émulsion et permet d'obtenir dans les tubes à centrifuger une phase phénolique inférieure, une phase aqueuse supérieure contenant les acides nucléiques et une interphase de protéines dénaturées qui ont perdu toute solubilité dans l'eau. On ne les retrouve à l'interphase que parce qu'elles sont plus denses que la phase aqueuse. D'ailleurs, si l'on centrifuge plus vite, une bonne partie de ce dépôt se retrouve au fond du tube. Après centrifugation, on décante doucement la phase supérieure aqueuse qui contient les RNA.

On ne peut décanter guère plus de 17 à 18 ml sans entraîner de protéines. Cette solution remise dans le même erlenmeyer est agitée dans les mêmes conditions que précédemment pendant 15 mn avec la moitié de son volume de phénol à 90 % soit 8,5 à 9 ml. Après une nouvelle centrifugation identique, on décante de nouveau et on obtient en général 15 ml auxquels on ajoute un demi volume de phénol (7,5 ml). Puis l'on fait une troisième et dernière agitation de 15 mn. Après centrifugation, la solution, environ 13 ml, est décantée et mise dans un bécher propre préalablement rincé à l'acétate de sodium.

A ce stade, la préparation ne contient plus de protéines, il faut la priver du phénol qu'elle contient.

Différents procédés ont été proposés. Nous avons choisi la précipitation alcoolique en présence de NaCl comme H. Hiatt (1962) et de RNA cellulaire non marqué (en général 800 γ) servant d'entraîneur du RNA viral.

Aux 13 ml décantés, sont ajoutés une solution molaire de NaCl en quantité suffisante pour avoir une concentration finale de 0,1 M et de l'alcool éthylique absolu en quantité double de la solution de RNA soit : pour 13 ml de solution de RNA, 3,9 ml de NaCl en solution molaire et 26 ml d'alcool.

La solution hydroalcoolique est alors maintenue au froid soit à -15° toute la nuit soit à $+4^{\circ}$ pour permettre une précipitation complète du RNA.

Après précipitation, la solution est centrifugée 5 mn à 6.000 rpm au froid et décantée par retournement. Les RNA collent généralement bien au fond des tubes. Ceux-ci sont égouttés sur papier filtre et le précipité lavé avec de l'alcool éthylique à 66° pour éliminer les traces de phénol l'imbibant. L'alcool dans lequel le phénol est soluble, est éliminé par centrifugation. Après deux lavages successifs, le précipité est dissout dans 1 ml de tampon acétate de sodium 0,01 M pH 5, NaCl 0,1 M. Un RNA de bonne qualité, non agrégé, exempt de protéines se dissout de façon explosive.

La solution ainsi préparée peut être utilisée de suite ou stockée à -20°C .

Analyse du RNA extrait

La détermination quantitative de la radioactivité présente dans l'extrait est insuffisante car elle ne donne aucun renseignement en ce qui concerne le poids moléculaire et l'homogénéité du RNA viral obtenu.

Deux méthodes de séparation des RNA sont possibles mais nous avons dans ce travail particulièrement utilisé la sédimentation dans un gradient de concentration de saccharose.

Centrifugation zonale en gradient de densité

Cette méthode d'analyse est assez ancienne. Elle a été utilisée la première fois par Linderström-Lang en 1937 pour mesurer la densité de solution aqueuse dans un gradient de solvants organiques.

En 1939 Behrens l'utilisait pour déterminer la densité des composants cellulaires. En 1951, Brakke l'adaptait à la purification des virus végétaux en gradients de saccharose. Actuellement, elle est très largement utilisée pour la séparation des virus, ribosomes, protéines, RNA.

Essentiellement, la méthode consiste à déposer une couche de la solution de particules à analyser sur une autre couche plus dense et à centrifuger à grande vitesse.

Pendant la centrifugation, les particules ayant des taille, forme et densité identiques, sédimentent comme une zone (sédimentation zonale) jusqu'à ce qu'elles atteignent un milieu de densité identique à elles-mêmes. Dans ces conditions, la séparation dépend seulement de la densité des particules. Si la centrifugation est stoppée plus tôt, une séparation zonale est réalisée qui est dépendante de la vitesse de sédimentation des différentes particules : c'est-à-dire du poids moléculaire, de la forme, de la densité.

C'est ce type de centrifugation zonale que nous avons utilisé pour déterminer la constante de sédimentation du RNA du virus de Rauscher.

Préparation du gradient de concentration

Dans presque toutes les expériences, nous avons utilisé un gradient de saccharose 20 % - 5 % dans le tampon de dissolution des RNA (acétate de Na 0,01 M pH 5, NaCl 0,1 M).

Pour préparer la colonne de gradient, nous avons utilisé l'appareil de Britten et Roberts (1960) (figure 4).

Nous obtenons de cette sorte un gradient linéaire d'un volume de 30 ml dans des tubes à centrifuger SW 25. Lorsque le gradient

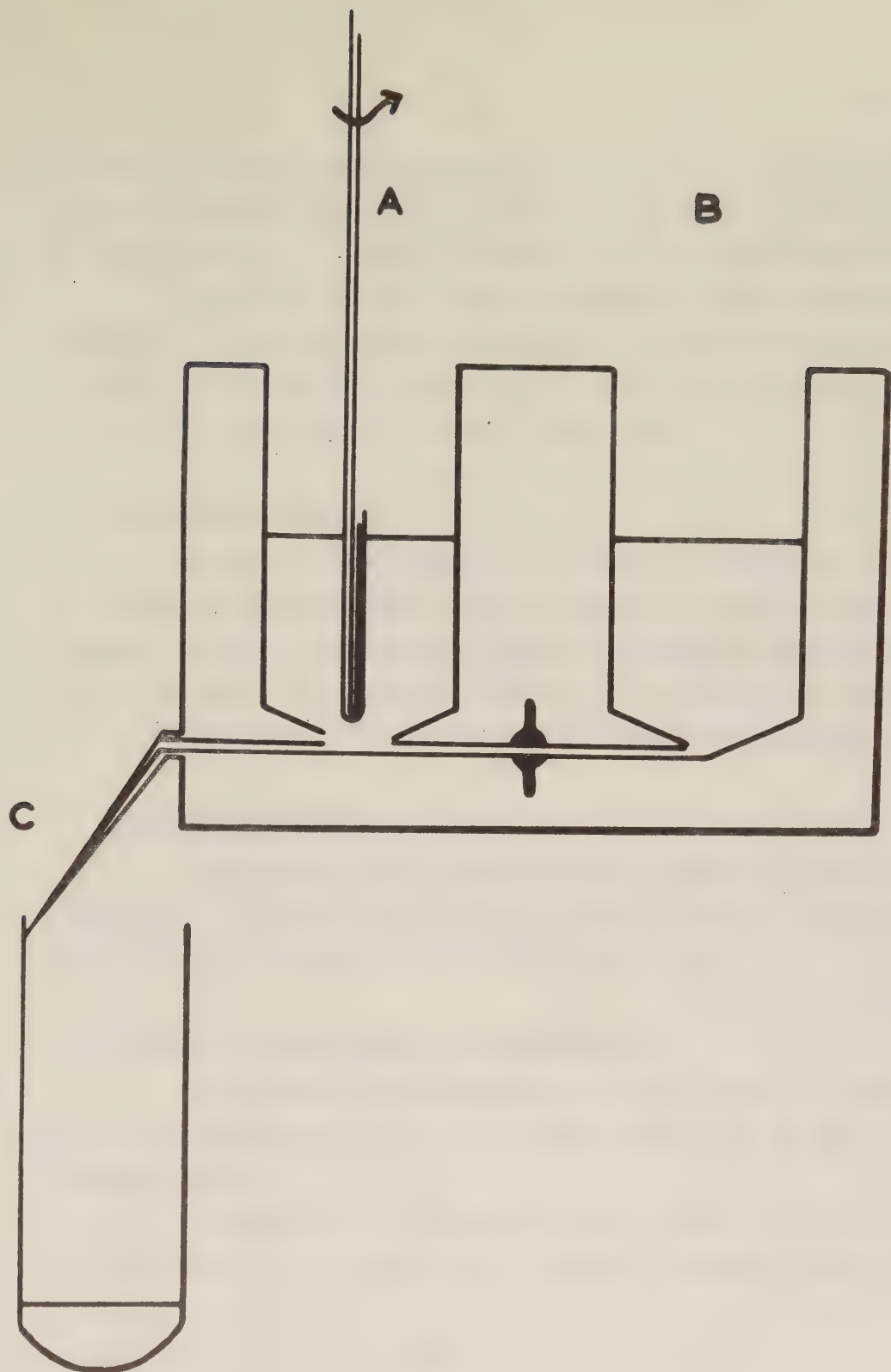


Fig. 4 : Appareil en lucite, pour la formation de gradients de concentration linéaires, dans les tubes du rotor SW 25 de la centrifugeuse Spinco L contenant 30 ml de solution. D'après Britten et Roberts (1960).

est prêt, on dépose très doucement à sa surface la solution à analyser (1 ml au maximum), moins si possible car pour le calcul de la constante de sédimentation, il convient d'avoir une couche infiniment mince.

Le tube SW 25 est alors centrifugé en prenant les précautions habituelles. Pour les RNA cellulaires, on centrifuge 15 à 18 heures à 18.000 tours/mn mais il suffit de 2 h 30 à 3 h 30 à 25.000 tours/mn pour le RNA viral qui est beaucoup plus lourd.

Récolte du gradient

En fin de centrifugation, le tube est obturé par un bouchon de caoutchouc percé et relié à une seringue qui permet de créer une certaine pression au-dessus du liquide. Le fond du tube est alors percé d'un petit trou avec une épingle. On recueille les gouttes par 8 à 9 dans des petits tubes de façon à obtenir 40 fractions environ.

Lecture du gradient

Sur chaque fraction recueillie, on mesure la densité optique à 260 mμ et la radioactivité sur un aliquot de 0,2 ml auxquels sont ajoutés 10 ml de liquide scintillant (Bray, 1960).

Calcul de la constante de sédimentation

La constante de sédimentation d'une particule représente sa vitesse de sédimentation par la force centrifuge, de Dune (1959), Schachman (1959).

La constante de sédimentation $S_{T,m}$ dans un milieu m à une température T est donnée par la formule de Martin et Ames (1961).

$$(E \quad 1) \quad S_{T,m} = \frac{dx/dt}{\frac{w^2}{x}}$$

où x représente la distance parcourue pendant la centrifugation par la particule en cm/seconde et w la vitesse angulaire en radians/seconde.

La constante de sédimentation $S_{T,m}$ est généralement extrapolée aux conditions standards de température + 20°C et de viscosité de l'eau à cette même température.

$$(E\ 2) \quad S_{20,w} = S_{T,m} \frac{\eta_{T,m} (d_p - d_{20,w})}{\eta_{20,w} (d_p - d_{T,m})}$$

L'équation 2 est directement applicable pour les calculs des "S" à partir des données expérimentales obtenues par centrifugation dans un milieu uniforme, sans gradient de concentration et donc dans une ultracentrifugeuse analytique.

Pour la détermination de la constante de sédimentation "S" du RNA viral, nous ne pouvions opérer de cette façon car elle nécessite beaucoup plus de matériel biologique que nous n'en disposions.

Lorsque la centrifugation a lieu dans un gradient de concentration, la transformation du "S" brut expérimental en $S_{20,w}$ peut se faire de la même façon mais l'équation 2 se complique beaucoup du fait que tout au long de la colonne de centrifugation la viscosité et la densité évoluent selon le gradient et on doit donc intégrer leurs valeurs entre les 2 limites correspondantes du gradient, soit le saccharose 5 % et la position de la bande de RNA viral, après centrifugation (Martin et Ames, 1961).

Outre la complexité du problème, un des paramètres échappe encore à la correction, il s'agit du volume spécifique partiel du produit à analyser. Celui-ci évolue également selon les termes du gradient et de façon inconnue.

Toutefois, si on dispose d'un étalon de centrifugation, la transformation de $S_{T,m}$ d'une substance x en $S_{20,w}$ devient beaucoup plus simple. En effet, connaissant par centrifugation analytique le $S_{20,w}$ d'un étalon, on détermine le $S_{T,m}$ expérimental : on pose alors l'équation :

$$S_{20,w}^x = \frac{S_{20,w}^{\text{étalon}}}{S_{T,m}^{\text{étalon}}} \times S_{T,m}^x$$

C'est cette dernière méthode que nous avons utilisée en nous servant comme étalon de centrifugation des RNA cellulaires froids, ajoutés comme entraîneur au moment de l'extraction.

Résultats

Après centrifugation de longue durée 15 h 30 à 20.000 t/mn, on obtient en UV trois pics caractéristiques des RNA cellulaires et correspondant aux RNA des cellules JLS V5 ajoutées comme entraîneur au moment de l'extraction. Il s'agit des RNA ribosomiaux 28 S - 16 S et du RNA de transfert.

En radioactivité pour la même sédimentation, on trouve au fond du tube uniquement localisé dans le premier tube un pic de radioactivité que nous appellerons "pic lourd" et au sommet de la colonne de gradient un autre pic appelé "pic léger" centré sur celui du RNA de transfert (figure 5).

Les 2 pics décelables par l'examen de la radioactivité sont constitués par du RNA comme le démontre la sensibilité à la RN ase.

Si on calcule le "S" correspondant à ce pic lourd, on trouve une valeur égale ou supérieure 45 S. Pour déterminer la constante de sédimentation de ce RNA, nous avons choisi de centrifuger 2 h 30 ou 3 h 30 à 25.000 rpm, ce qui permet de le placer dans le quart supérieur du gradient utilisé.

Après centrifugation de 2 h 30 à 25.000 t/mn, les RNA cellulaires sédimentent très peu, par contre en radioactivité, on individualise 2 pics.

L'un est situé tout en haut du gradient, il correspond au pic léger, et un autre pic au tiers supérieur du gradient correspond au pic lourd. Le calcul du "S" effectué pour ce dernier donne la valeur de 70 S ramené aux conditions standards (figure 6).

Caractérisation des pics radioactifs

Les pics radioactifs léger et lourd ont été soumis à l'action de la RN ase (50 γ /ml dans le tampon Tris-EDTA). Ils sont tous les deux hydrolysés mais on peut déjà noter une petite différence de

Centrifugation 15 heures 30, 20.000 t/mn, + 4C, d'un ARN-32P extrait
des surnageants de culture JLS V5.
Entraîneur ARN de cellules JLS V5 non marquées.
Densité optique (—●—) 3 pics correspondant aux ARN cellulaires : 28 S
et 18 S (ribosomaux) 4S (transfert).
Radioactivité (—●—) un pic léger au niveau de l'ARN de transfert,
un pic lourd au fond du tube.

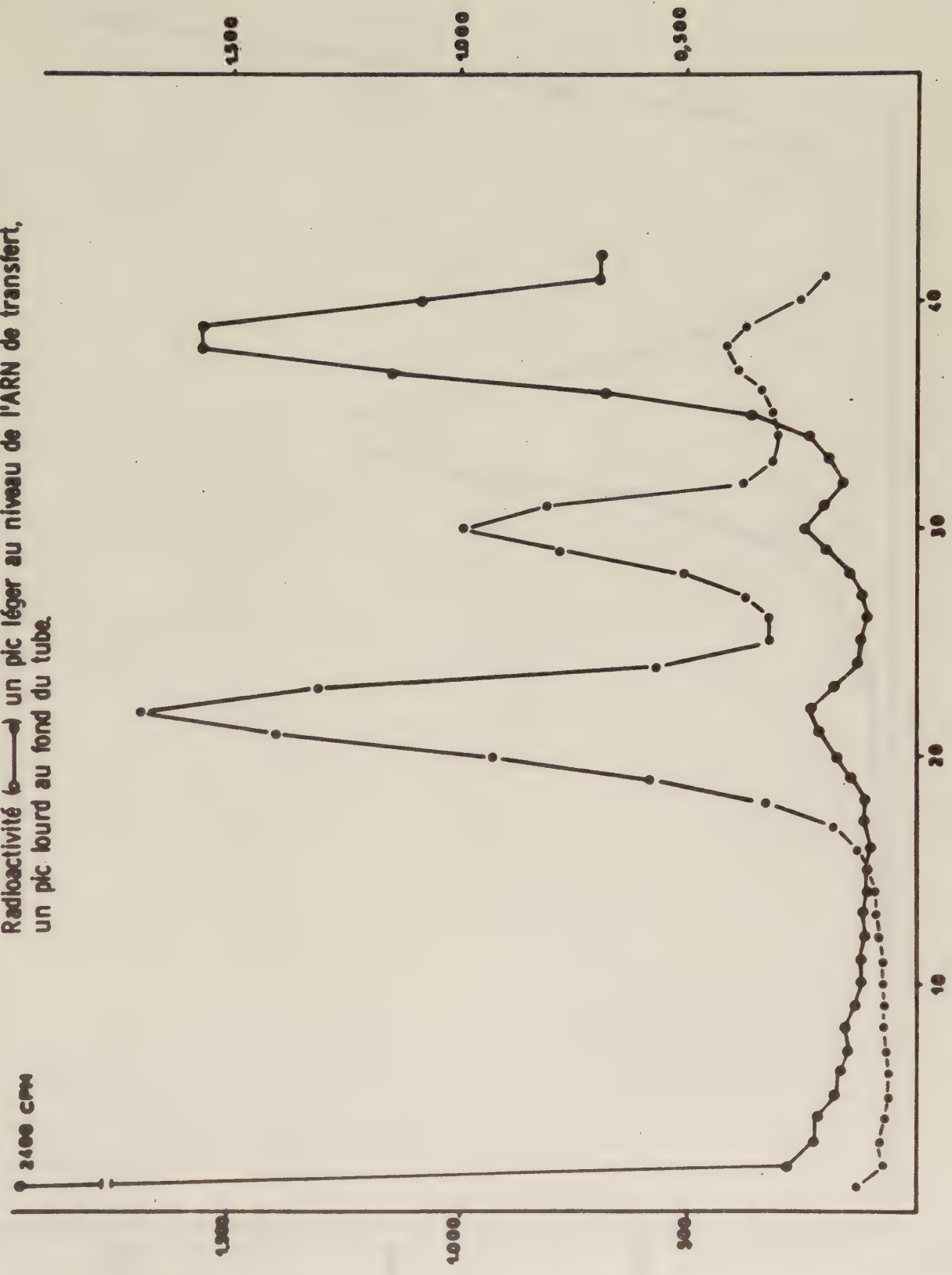
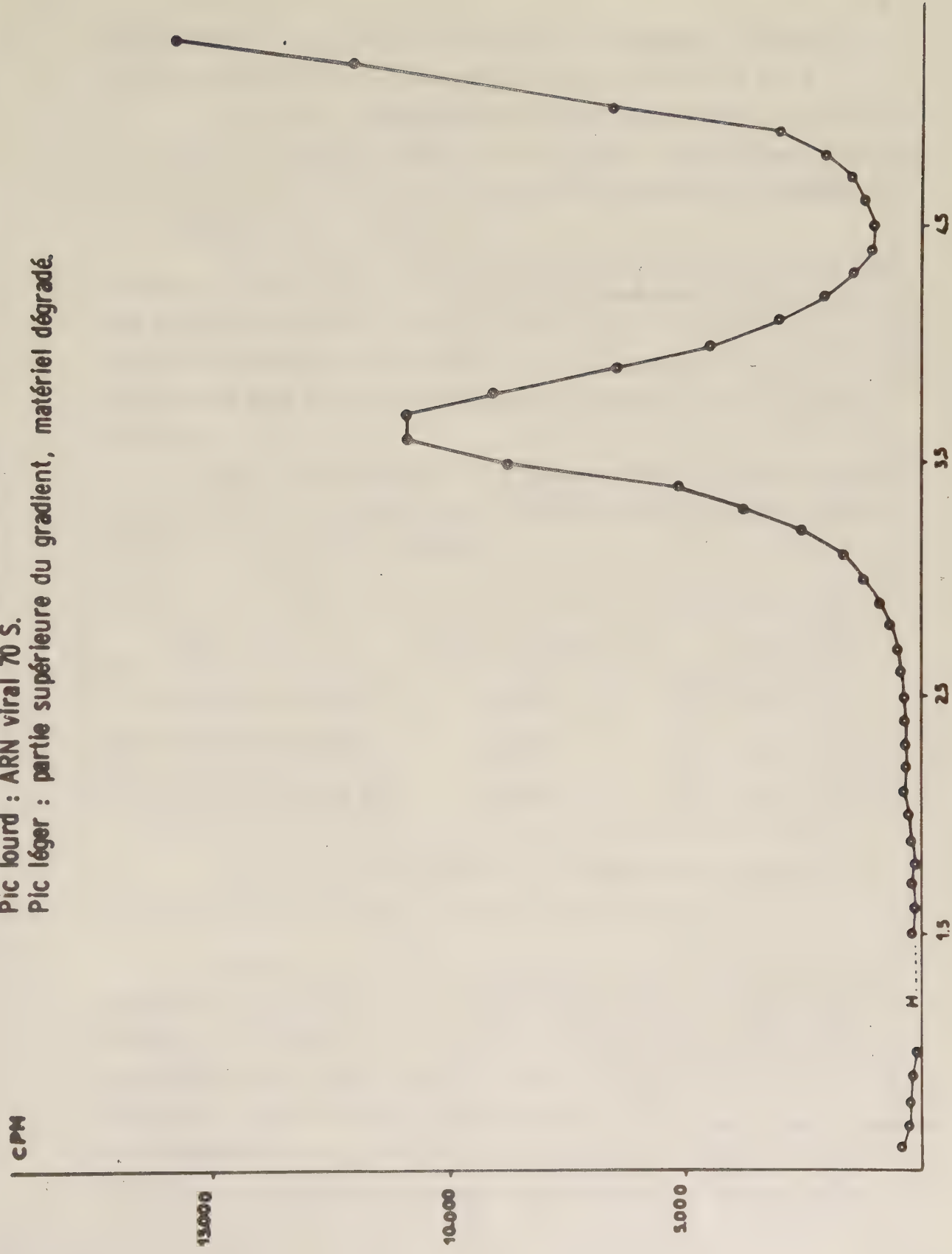


Figure 6 : Même préparation que la figure 21.

Centrifugation 2 heures 30 à 25.000 t/mn.

Pic lourd : ARN viral 70 S.

Pic léger : partie supérieure du gradient, matériel dégradé.



comportement, alors que le pic léger est entièrement sensible, le pic lourd donne un résidu non hydrolysable d'environ 5 à 6 %.

Bien que l'homogénéité et la parfaite symétrie du RNA 70S rendent peu vraisemblable qu'il puisse s'agir d'une structure agrégée soit par des ions métalliques soit par des liaisons non covalentes, il convenait de s'en assurer.

L'existence d'une structure agrégée par des liaisons non covalentes a été testée par l'étude du comportement du RNA lourd dans des solutions de forces ioniques différentes. Le RNA isolé en gradient saccharose habituel est dialysé contre des solutions de forces ioniques différentes puis mis sur gradient saccharose fait avec ces mêmes solutions.

Dans ces conditions, on n'observe pas de variation notable de la constante de sédimentation (tableau) pour des forces ioniques allant de $\Gamma/2 = 0,160$ à $0,00160$.

Tampons (pH 7)	Force ionique $\Gamma/2$	$S_{20,w}$
0,1 M ClNa 0,01 M PO_4^3	0,160	68
0,01 M ClNa 0,001 M PO_4^3	0,0160	62
0,001 M ClNa 0,0001 M PO_4^3	0,00160	65

Variation de la constante de sédimentation du RNA du virus de Rauscher en fonction de la force ionique.

D'autre part, les RNA s'aggrègent plus ou moins selon la présence de différents cations généralement divalents (Marcot-Queiroz, J. et Monier, R., 1965), aussi paraissait-il intéressant de déterminer le comportement de ce RNA en présence d'EDTA pouvant complexer les cations divalents à l'état de trace. Le culot viral obtenu après centrifugation est homogénéisé dans un tampon Tris 0,001 M pH 7,2-EDTA 10^{-2} additionné de PVS comme inhibiteur RNasique. L'extraction est ensuite menée

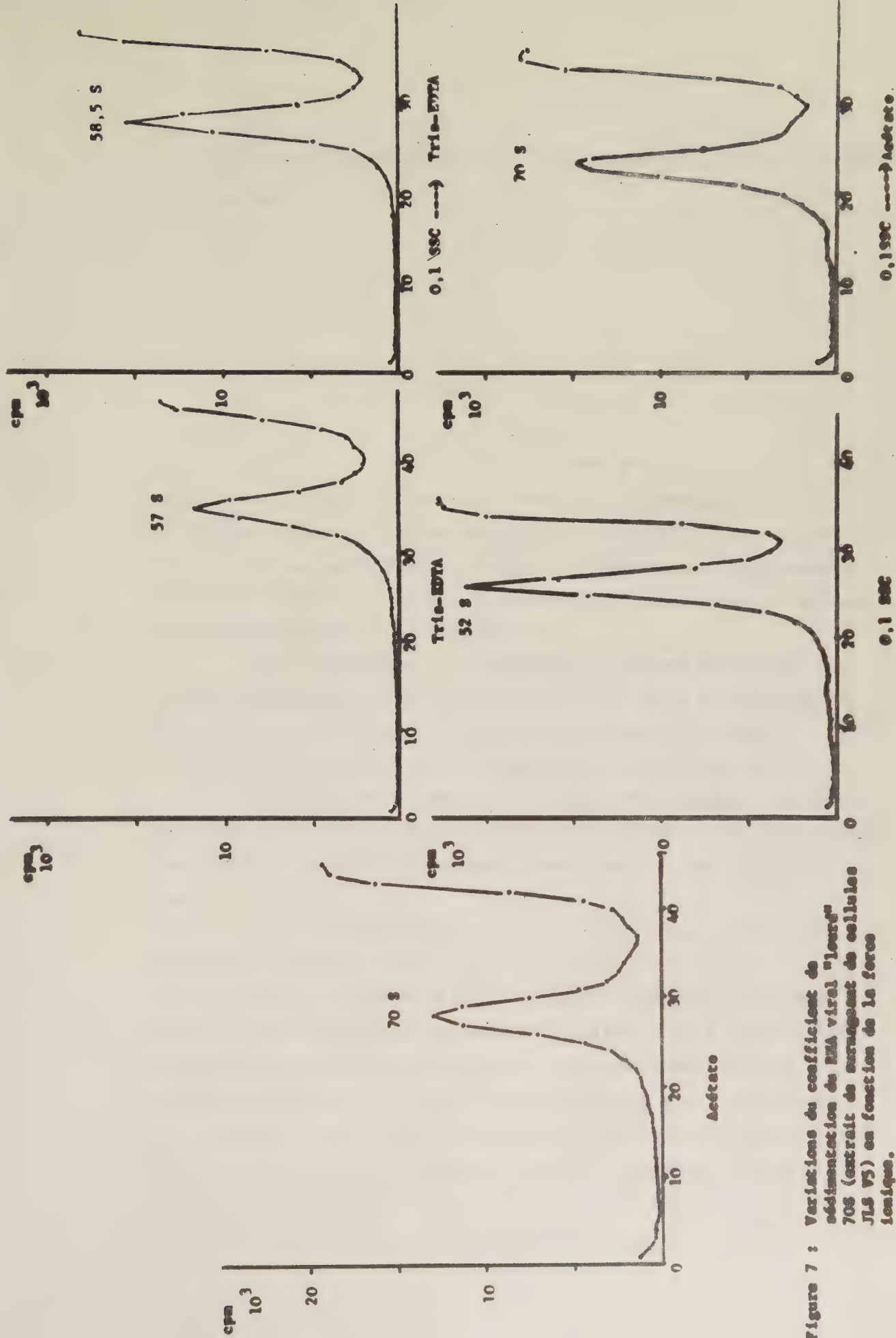
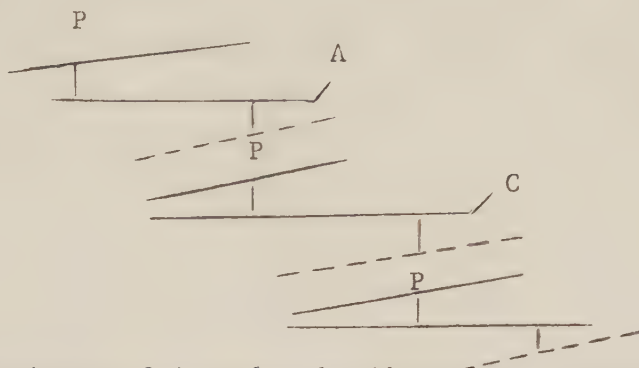


Figure 7 : Variations du coefficient de sédimentation de RNA viral "leure" 70S (extrait de surrangement de cellules JLS V5) en fonction de la force ionique.

Si nous représentons une fraction de la chaîne nucléotidique par ce schéma



l'incorporation se fait selon le découpage en pointillé, mais l'hydrolyse selon les traits pleins. Il s'ensuit que si la base A est de l'Adénine et C de la Cytosine, le phosphore primitivement lié à la Cytosine en position 5' et incorporé avec elle, se trouve après hydrolyse lié en 3' à l'Adénine.

Or, l'analyse de la composition en bases est fondée sur la proportionnalité entre la quantité de ^{32}P lié à une base et la quantité de cette dernière, ce qui implique que les quatre nucléosides 3' phosphate aient une activité spécifique égale.

En ce qui nous concerne, le temps de marquage ayant été long (2 à 3 jours) l'activité spécifique de chaque pool nucléotidique a atteint son équilibre et on peut penser qu'elle est égale pour tous.

Les mononucléotides obtenus par hydrolyse alcaline sont séparés par chromatographie sur résines échangeuses d'ions.

Dans la méthode de Katz et Comb (1963) que nous avons utilisée, les nucléotides en solution dans HCl 0,05 N sont chargés sur une résine cationique, Dowex 50. Dans ces conditions, l'acide uridilique (UMP) qui n'a pas de charge positive n'est pas retenu par la colonne et est élué directement. Les autres nucléotides sont fixés à la colonne. Par passage d'eau distillée, on modifie l'état d'ionisation des nucléotides ce qui se traduit par l'élution de l'acide guanilique (GMP) puis par celle groupée des acides

cytidilique (CMP) et adénylique (AMP) qu'il n'est pas possible de séparer dans ces conditions.

La séparation de CMP et de AMP est réalisée par échange sur résine anionique Dowex 1 x 8. A pH 7, CMP et AMP se fixent sur cette résine par leurs groupements acides. On peut ensuite les éluer, dans l'ordre CMP puis AMP par passage d'une solution d'acide formique de plus en plus concentrée (figure 8).

Les résultats obtenus apparaissent dans le tableau suivant :

UMP	GMP	CMP	AMP	Rapport
23,7 %	26,3 %	25,6 %	24,4 %	$\frac{G + C}{A + U} = 1,07$

Composition en bases du RNA 70 S du virus de Rauscher

Ces résultats correspondent à des moyennes de plusieurs expériences faites d'une part sur plusieurs préparations de RNA et d'autre part au moins deux fois sur chaque préparation (Galibert, F. et Col., 1965).

L'étude de la composition en bases et plus particulièrement des rapports G/C et A/U ne permet pas de trancher sur l'existence d'une structure monocaténaire ou bicaténaire.

En effet, si ces rapports ne sont pas strictement égaux à 1 comme le laisse prévoir une structure bicaténaire, ils en sont suffisamment proches pour ne pas permettre de l'écarter et dans tous les cas, ils permettent d'envisager un appariement de bases sur une grande partie de la molécule.

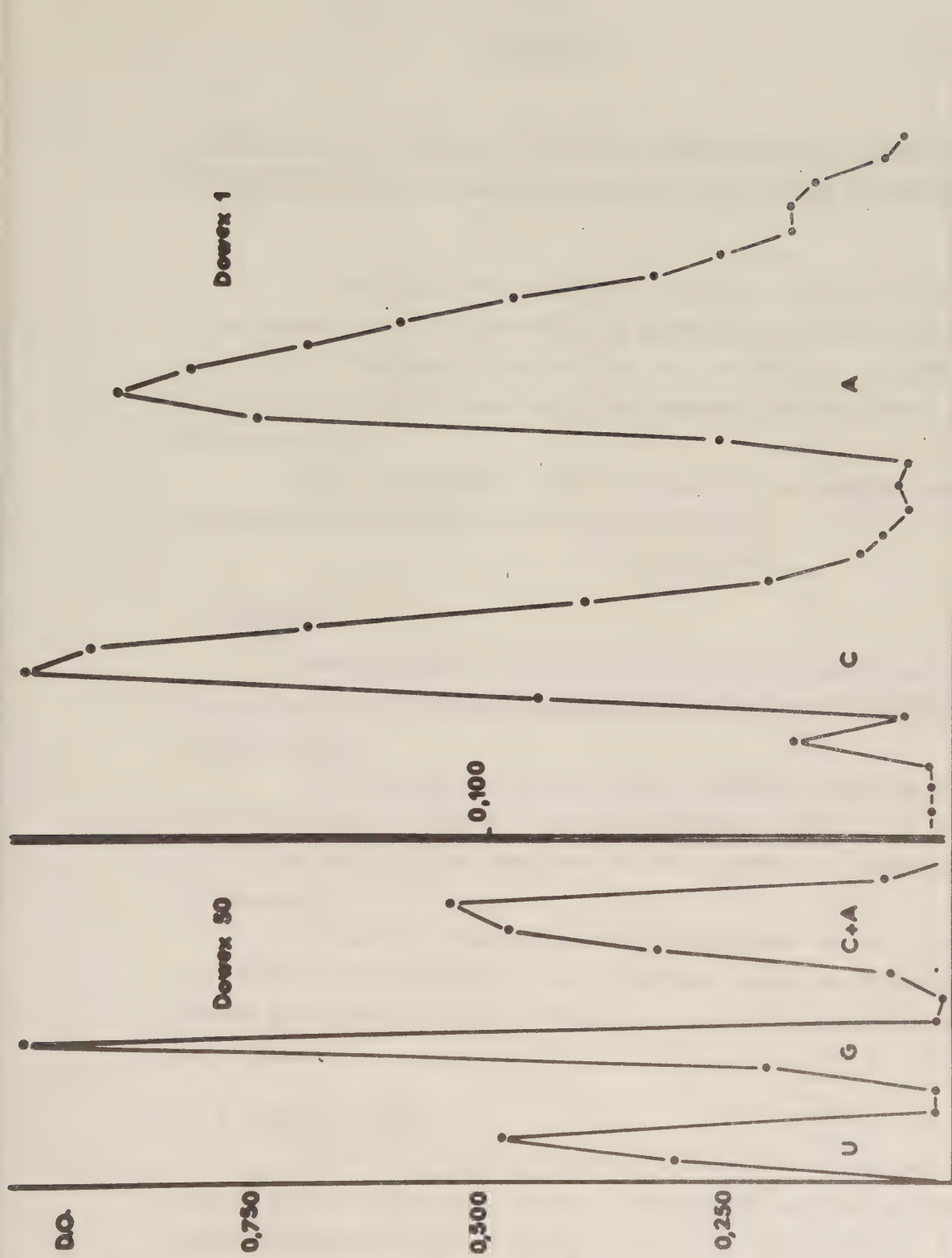


Figure 8 : Chromatographie sur résines échangeuses d'ions. Séparation des mononucléotides obtenus par hydrolyse alcaline. Premièrement, par passage sur Dowex 50, isolement des acides U, G et du groupe C + A. Ensuite, par passage sur Dowex 1, séparation des acides C et A.

CHAPITRE II

ETUDE DE LA REPLICATION VIRALE PAR INCORPORATION DE MOLECULES RADIOACTIVES DANS L'ACIDE RIBONUCLEIQUE DES VIRIONS EXTRACELLULAIRES

La réplication du virus de Rauscher dans les cellules JLS V5 a été suivie par l'incorporation de molécules marquées dans le RNA viral, qu'il s'agisse du RNA enclos dans les virions synthétisés par la cellule et libérés dans le milieu extracellulaire, ou du RNA encore intracellulaire.

Dans ce chapitre, nous envisagerons les expériences se rapportant au RNA des virions extracellulaires.

I - METHODES

Deux méthodes ont été utilisées afin de mettre en évidence une radioactivité liée aux particules virales dans le surnageant de cellules JLS V5.

a) mesure de la radioactivité incorporée dans le RNA viral, après extraction du RNA du virus préalablement purifié, et passage en gradient SDS afin de localiser le pic "lourd" sur lequel portent les mesures.

b) mesure de la radioactivité incorporée dans le RNA viral et présente au niveau des virions complets, après purification de ceux-ci par gradient à l'équilibre, suivi ou non de précipitation par le TCA.

A - Gradient SDS

Les cellules JLS V5 sont cultivées soit en flacons "pharmacie" soit en flacons plastique (Falcon, 250 ml), et marquées en phase de croissance exponentielle avec 5 μ c/ml de 32 P ou d'uridine 3 H pendant 48 heures.

Les surnageants sont ensuite recueillis et le virus purifié par la méthode de Moloney. Les culots viraux sont recueillis et homogénéisés dans 1 ml de tampon acétate de sodium 0,01 M pH 5, NaCl 0,1 M, SDS 1 %, puis laissés à la température du laboratoire de huit à dix heures ; on prépare ensuite des gradients saccharose 20 % - 5 % dans du tampon acétate de sodium 0,01 M-NaCl 0,1 M - SDS 0,4 % et contenant 10 γ /ml de polivinylsulfate (PVS).

On dépose alors 0,8 ml de l'homogénéisat des culots sur les tubes ainsi préparés qui sont ensuite centrifugés dans un rotor SW 25 (Spinco, 25.000 tours/mn, 3 heures, 20°C).

Les gradients sont recueillis par fractions d'environ 0,8 ml par percement du fond des tubes. Cette opération est effectuée à la température du laboratoire directement dans des tubes à scintillation liquide. On ajoute 10 ml de liquide de Bray par fraction et la radioactivité de chacune d'elle est mesurée.

B - Gradients à l'équilibre

Le virus marqué (^{32}P ou uridine 3 H) est extrait des surnageants de culture de cellules JLS V5 selon la méthode décrite dans A). Après la dernière centrifugation de 90 mn à 21.000 t/mn, les culots sont homogénéisés dans 5 ml de tampon Tris-HCl 15. 10^{-4} M à pH 7,4 - 0,25 M saccharose. Toutes ces opérations sont effectuées à + 4°C.

A partir de deux solutions A (60 %) et B (15 %) de saccharose dans un tampon Tris-HCl à pH 7,4 on prépare, par mélange en proportions variables une série de solutions.

A	B	Concentrations obtenues
30 ml	0 ml	60 %
20 ml	10 ml	48,75 %
15 ml	15 ml	37,5 %
10 ml	20 ml	26,25 %
0 ml	30 ml	15 %

Des tubes à gradients en polypropylène pour rotor 40 (Spinco) sont ensuite utilisés de la façon suivante : 5 couches de 2 ml des solutions de saccharose ci-dessus préparées sont déposées successivement en évitant tout mélange en commençant par 60 % et terminant par 15 %.

Ceux-ci sont ensuite laissés 24 heures à + 4°C afin de laisser diffuser le saccharose d'une couche à l'autre et obtenir ainsi un gradient linéaire 60 % - 15 %. On superpose alors sur les 10 ml des tubes, 0,8 ml de la suspension virale et l'ensemble est soumis à une centrifugation de 15 à 18 heures à 40.000 t/mn à la température de + 4°C.

Les gradients sont recueillis à l'aide d'une pompe péristaltique grâce à un montage que nous avons mis au point et qui permet de recueillir quatre gradients à la fois.

Pour cela, on plonge avec précaution un tube capillaire au fond du tube de gradient et le liquide est aspiré et recueilli à partir du fond par fractions séparées de 0,33 ml dans des tubes de Kahn. On obtient ainsi 29 ou 30 fractions. Un tube à gradient est utilisé pour l'expérimentation et un second pour la lecture de l'indice de réfraction.

Dans certaines expériences, le RNA viral est précipité par 0,5 ml de TCA à 10 % après traitement au SDS à 10 % (2 gouttes). On agite chaque tube à l'aide d'un appareil de type Vortex, ils sont ensuite conservés à - 20°C avant d'être utilisés.

Chaque fraction est alors déposée sur membrane Millipore GS 0,22 μ et lavée avec du TCA 5 %. Les membranes sont ensuite séchées puis mises dans des tubes à scintillation liquide dans lesquels on ajoute 10 ml de liquide scintillant normal au toluène.

La radioactivité contenue dans chaque tube est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide Tricarb (Packard).

II - RESULTATS

A - Détection du virus extracellulaire

1°) Résultats obtenus par gradient à l'équilibre sur les particules entières

Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à mettre en évidence des particules virales dans le surnageant de culture de cellules JLS V5 par la méthode du gradient saccharose à l'équilibre (60 % - 15 %). Lorsque les cultures de cette cellule sont entretenues dans un milieu contenant du ^{32}P comme il est indiqué dans le paragraphe précédent, on obtient un pic de radioactivité correspondant à une densité voisine de 1,17 (figure 9A). Ce résultat est en parfait accord avec ceux obtenus par Mora et McFarland (1965) et Chenaille (1968), de plus l'observation au microscope électronique des fractions constituant le pic de radioactivité révèle l'existence d'un grand nombre de particules virales de type C, ce qui confirme la valeur de notre résultat.

Nous avons également étudié l'influence d'un stockage du surnageant cellulaire à + 4°C et à - 20°C, pendant 48 heures, avant la purification du virus et la mise en gradient. Les résultats sont représentés dans les figures 9B et 9C où l'on observe une nette diminution de la quantité totale de radioactivité, mais aucun changement qualitatif, le pic de radioactivité correspondant toujours à une densité voisine de 1,17.

Notons toutefois que la conservation du virus dans ces conditions semble nettement meilleure à + 4°C qu'à - 20°C.

2°) Résultats obtenus par gradient SDS

Des surnageants de culture de la cellule JLS V5 (cultivées en présence de ^{32}P), ont été concentrés par la méthode de Moloney, puis le RNA des particules virales sédimentées a été extrait par le SDS et centrifugé dans un gradient saccharose 20 % - 15 % selon la méthode précédemment décrite.

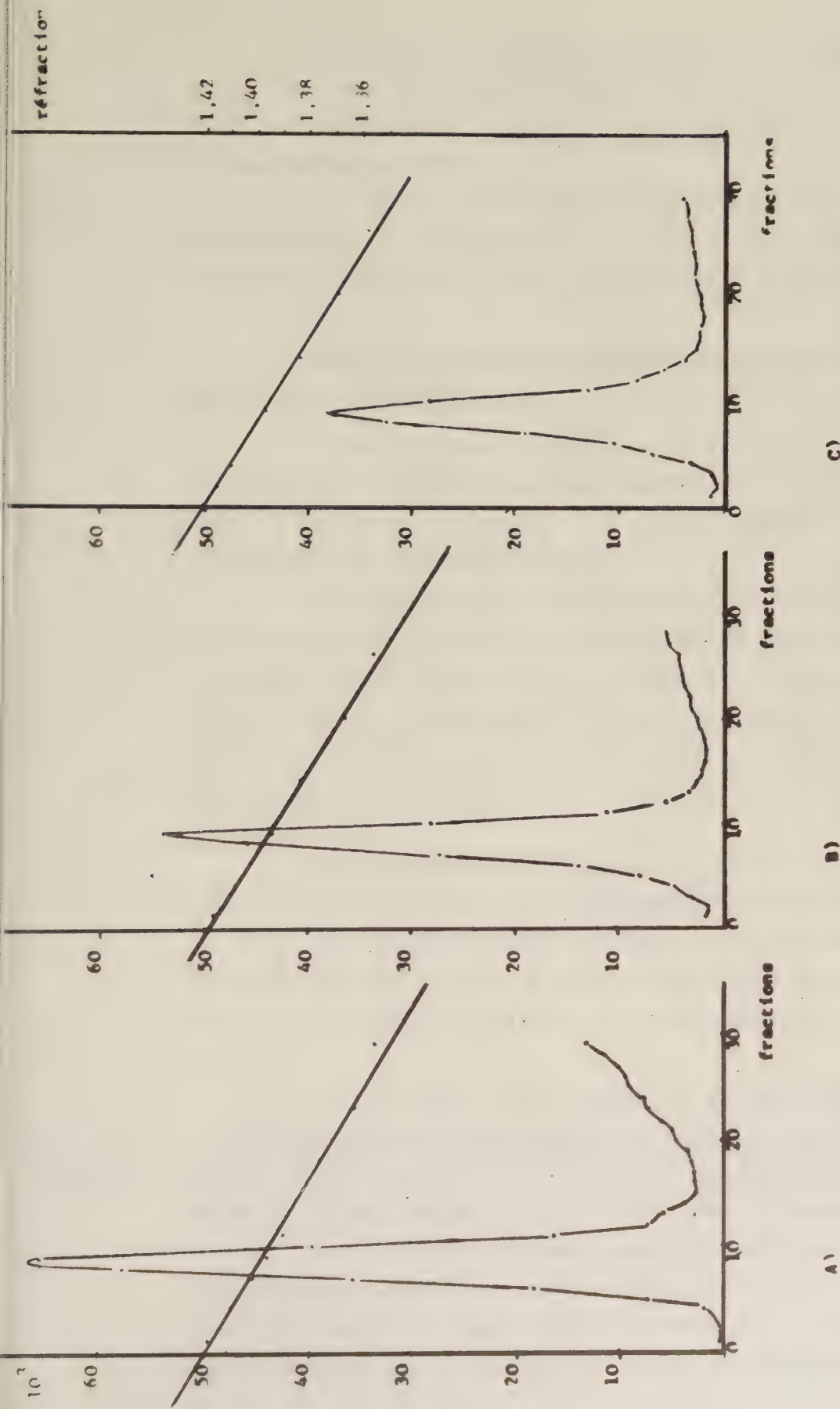


Figure 9 : Radioactivité (^{32}P) incorporée dans les virions après purification par gradients à l'équilibre 60 %-15 %.

Centrifugation de 18 heures à 40.000 t/mn à $+4^{\circ}\text{C}$.

A) Pic de densité 1,17.

B) Influence de la conservation des surnageants à $+4^{\circ}\text{C}$ pendant 48 heures.

C) Influence de la conservation des surnageants à -20°C pendant 48 heures.

Le résultat d'une telle expérience est présenté dans la figure 10 où l'on voit un pic de radioactivité très net correspondant au RNA viral extracellulaire et auquel on peut assumer une constante de sédimentation de 70 S.

Des expériences similaires effectuées avec la cellule HeLa, ne permettent pas l'observation d'un tel pic de radioactivité, ce qui montre bien que celui-ci doit être associé à la présence du virus.

B - Etude de la cinétique d'incorporation des traceurs dans le RNA des virions extracellulaires

On a pu suivre l'apparition du virus dans le surnageant des cellules JLS V5 après un marquage des cellules pendant un temps très court (5 mn) avec de l'uridine 3 H et des chasses à l'uridine, cytidine et thymidine de temps différents.

Après 24 heures de culture, lorsque la couche cellulaire devient continue, les cellules sont marquées avec un milieu contenant du sérum de veau dialysé et de l'uridine 3 H ($50 \mu\text{c/ml}$). Au bout de 5 mn, le milieu de marquage est éliminé et remplacé par du milieu de chasse (hydrolysate de caséine, 10^{-3} M uridine, 10^{-3} M cytidine, 10^{-3} M thymidine, 15 % sérum de veau), après rinçages de la couche cellulaire avec ce milieu.

On recueille les surnageants au bout de 45 mn, 1 h 15, 1 h 45, 6 h, 12 h et 14 heures. Les purifications sont faites immédiatement et les culots traités au SDS comme décrit dans le chapitre méthode. Après gradient de 3 heures à 25.000 t/mn à 20°C (Spinco) et comptage de la radioactivité on obtient les courbes décrites dans les figures 11 et 12.

On peut noter sur la figure 11 qu'aucun pic viral lourd 70 S n'est présent dans le surnageant des cultures à 45 mn, 1 h 15, 1 h 45 après le marquage. Par contre, on voit apparaître le pic à la 6ème heure, et il se précise à 12 h et 14 h après le marquage.

Sur la figure 12 nous avons représenté sur papier semi-logarithmique, la radioactivité totale présente au niveau du RNA viral lourd en fonction du temps. Cette radioactivité totale a été calculée en additionnant la radioactivité de chacune des fractions composant le pic

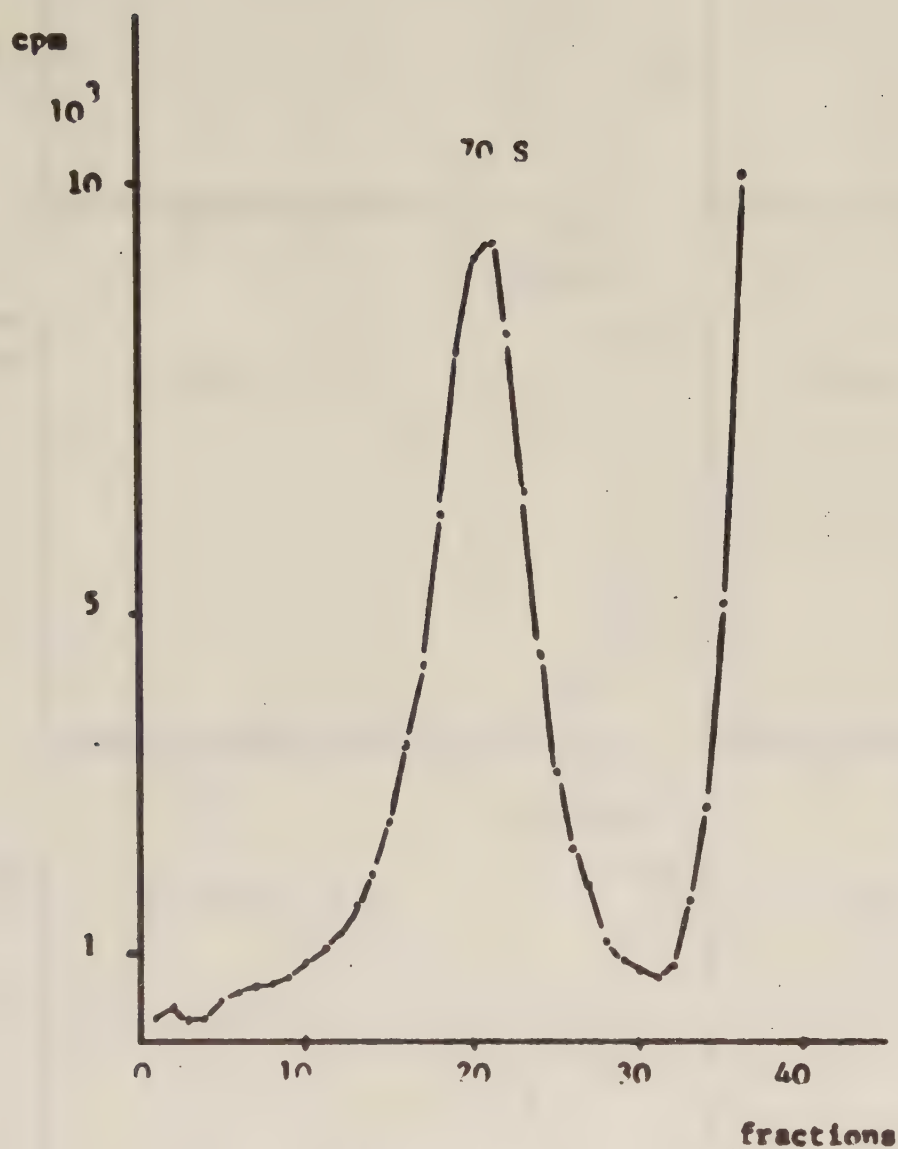


Figure 10 : Radioactivité (^{32}P) incorporée dans le RNA viral "lourd" : extraction du RNA du virus purifié et centrifugation en gradient SDS 0,4 % - 20 % - 5 % saccharose, (25.000 t/mn pendant 3 heures à + 20°C).

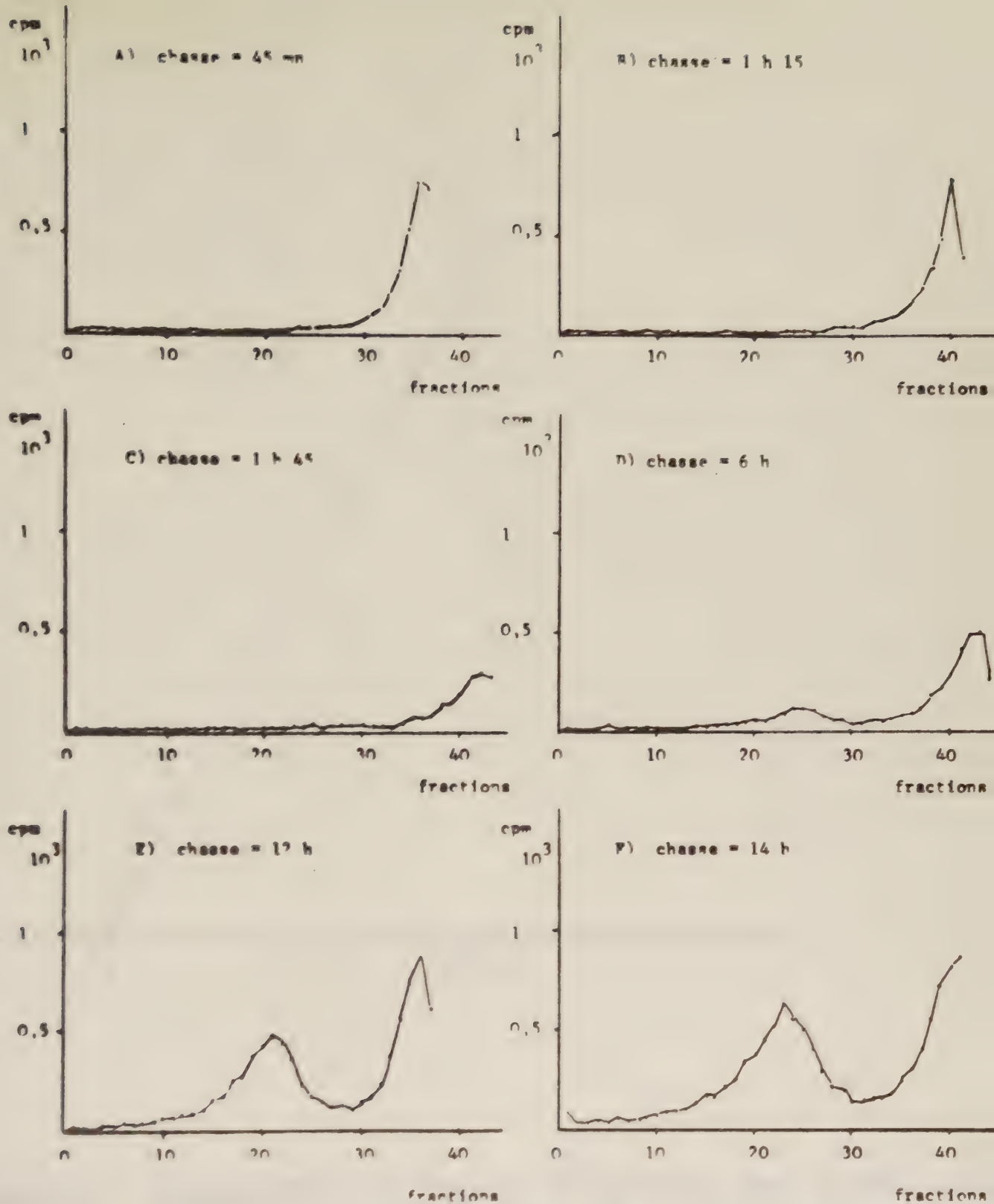


Figure 11 : Incorporation du traceur dans le RNA des virions extracellulaires après marquage des cellules JLS V5 pendant 5 mn par l'uridine ^3H (50 $\mu\text{c}/\text{ml}$), puis chasse à l'uridine 10^{-3} M, cytidine 10^{-3} M, thymidine 10^{-3} M pendant des temps différents.
Gradients SDS 0,4 % - 20 % - 15 % saccharose 25.000 t/mn à + 20 %.

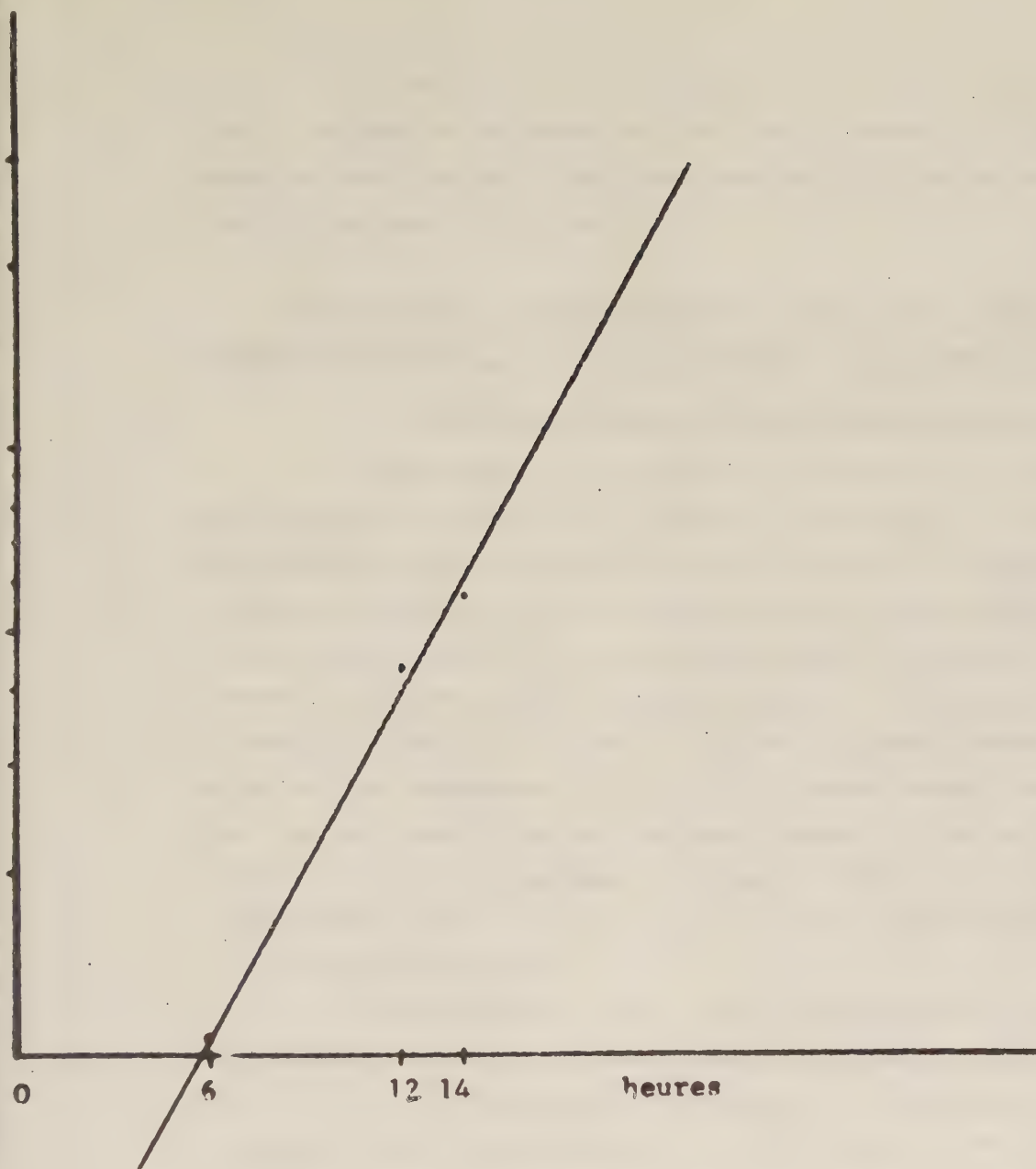


Figure 12 : Incorporation du traceur (H^3 -uridine) dans le RNA des virions extracellulaires produits par les cellules JLS V5 en fonction du temps. Echelle semi-logarithmique. Chaque point est obtenu en additionnant la radioactivité de chacune des fractions composant le pic 70S.

On peut voir que la courbe ainsi obtenue est une exponentielle dont l'extrapolation permet de fixer aux alentours de 6 heures après le marquage bref, la sortie des premières molécules de RNA viral marqué incorporées dans les virions.

C - Etude de l'incorporation des traceurs dans le RNA des virions extracellulaires en fonction des conditions de culture de la cellule

1°) Influence du support de croissance : verre ou plastique

Cette étude a été faite après culture de la cellule JLS V5 sur bouteille de verre ou de plastique. Pour cela, les cultures ont été effectuées dans du milieu contenant soit du ^{32}P ($6 \mu\text{c/ml}$) soit de l'uridine tritiée ($6 \mu\text{c/ml}$), ajoutés 24 ou 35 heures après la mise en culture des cellules. Le virus contenu dans le surnageant a été extrait à des intervalles de temps réguliers (6,8, et 10 heures après le marquage dans les cultures faites préalablement pendant 35 heures en milieu non radioactif ; 12, 14 et 16 heures après le marquage dans les cultures faites préalablement pendant 24 heures dans ce même milieu ; ceci afin de grouper les temps de sortie virale qui s'échelonnent ainsi : 36, 38, 40, 41, 43 et 45 heures après la mise en culture des cellules.

La purification virale a été réalisée selon la méthode précédemment décrite de Moloney suivie d'un gradient saccharose (60 % - 15 %) à l'équilibre et précipitation du RNA par le TCA en présence de SDS. Les comptages de la radioactivité ont tous été effectués le même jour. Deux expériences ont été faites par point.

Les résultats obtenus sont présentés dans les figures 13 et 14 où l'on a exprimé en coordonnées semi-logarithmiques, la radioactivité totale présente dans les virions en fonction du temps. On retrouve une courbe de type exponentiel dont l'extrapolation sur l'axe des abscisses permet de calculer le temps auquel apparaissent les premiers virions marqués dans le milieu de culture. On note que la sortie du virus est plus rapide (1 h 30) lorsque les cellules poussent sur plastique que lorsqu'elles poussent sur verre (4 h 30 à 5 h).

Figure 13 : Radioactivité totale présente dans les virions en fonction du temps après marquage au ^{32}P ($6 \mu\text{c/ml}$) et à l'uridine ^3H ($6 \mu\text{c/ml}$) de cellules JLS V5 cultivées sur bouteilles type "Pharmacie" en verre.

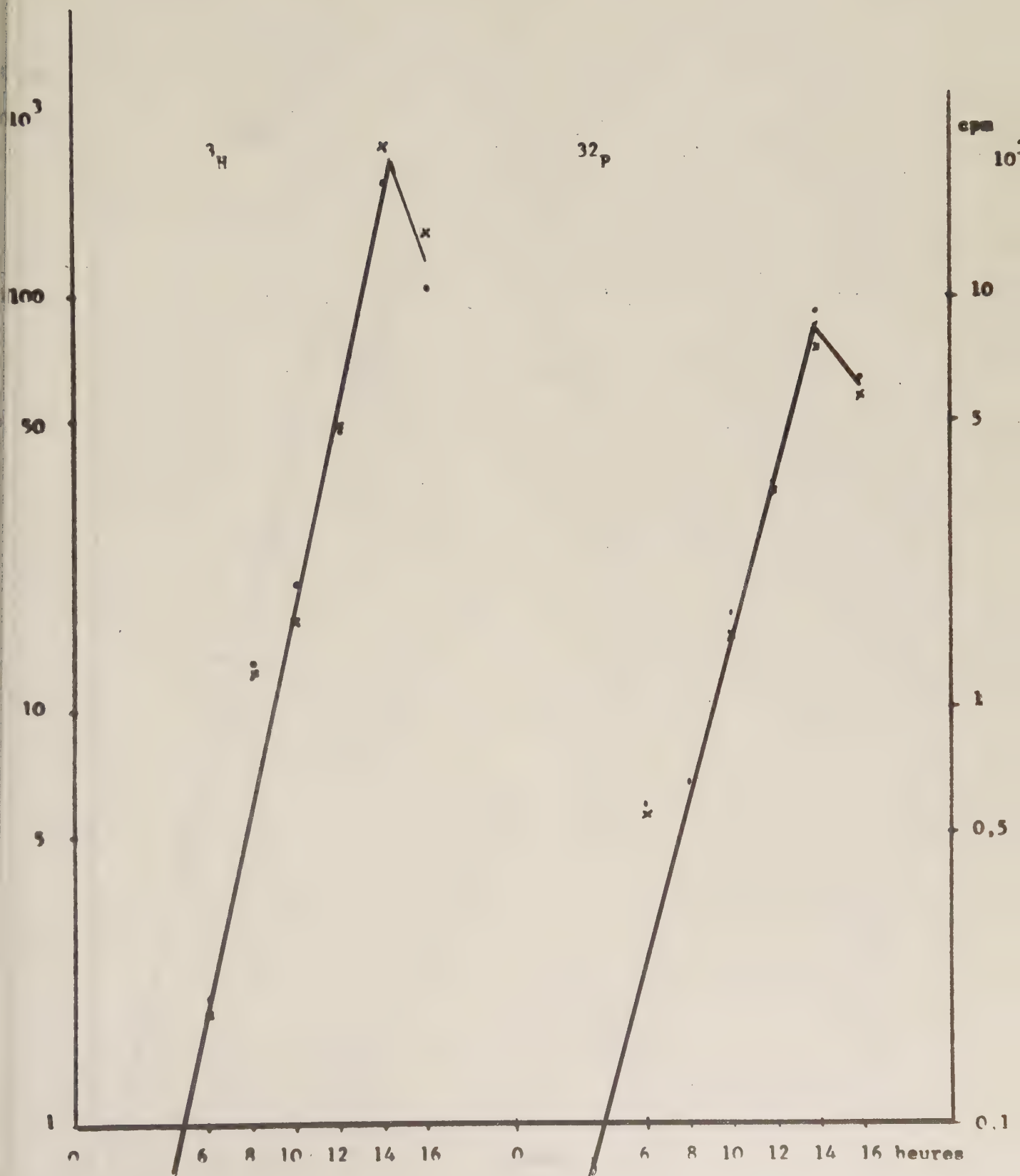
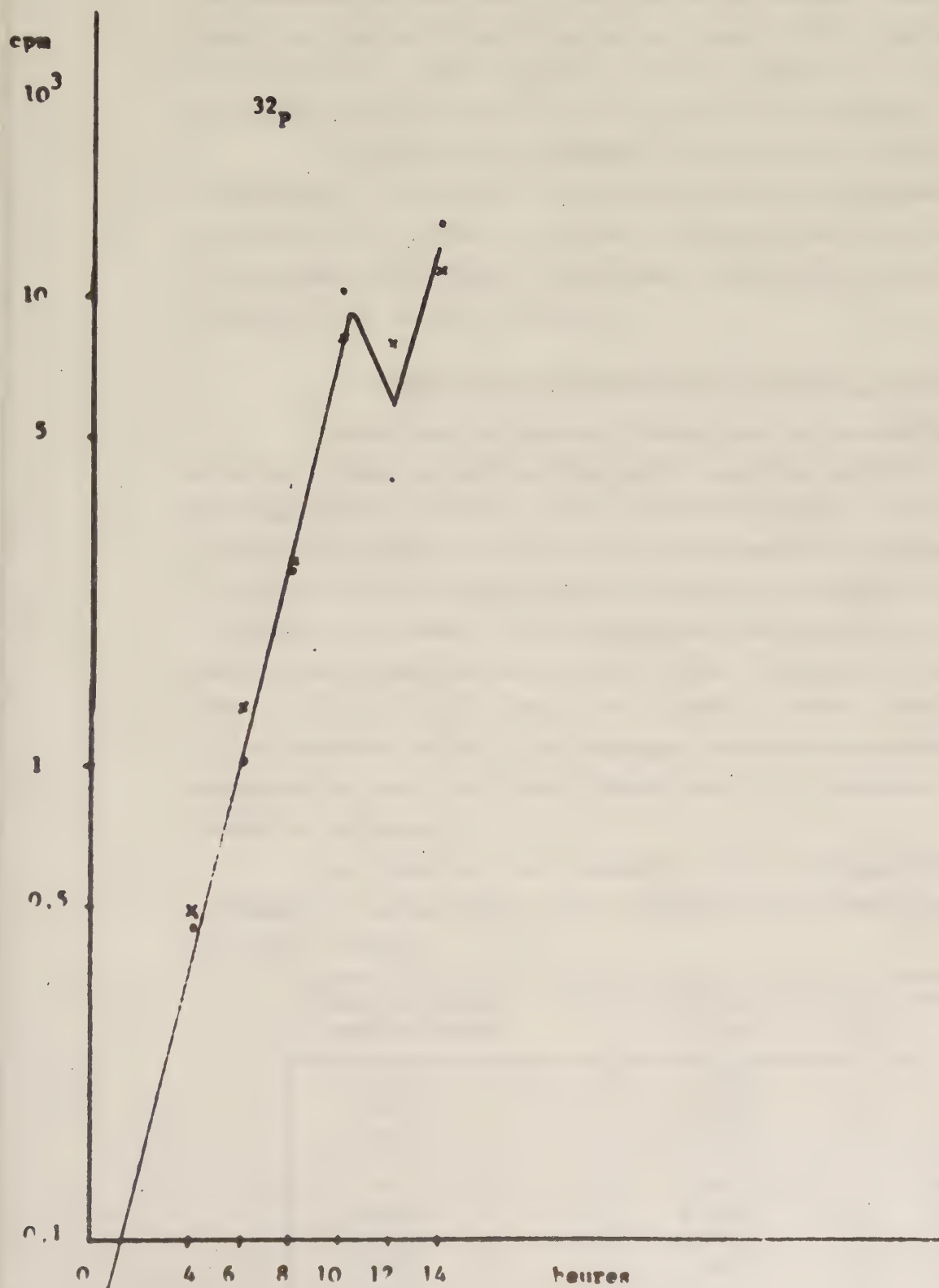


Figure 14 : Radioactivité totale présente dans des virions en fonction du temps après marquage au ^{32}P ($6\mu\text{C/ml}$) de cellules JLS V5 cultivées sur bouteille type "Falcon" en plastique.



2°) Influence de la multiplication cellulaire

Nous venons de voir que le facteur support de croissance cellulaire avait une influence sur la sortie du virus mais on pouvait également penser que des facteurs purement cellulaires influençaient les processus de synthèse virale. On a des raisons théoriques de penser que toutes les cellules de la lignée JLS V5 produisent du virus, il doit y avoir équilibre entre la synthèse des virions et la multiplication cellulaire (cf. chapitre I de ce travail).

Pour étudier ce problème, nous avons fait deux types d'expérience : le premier consistant à étudier la radioactivité incorporée dans le RNA des virions en fonction de l'âge des cellules, le deuxième, à déterminer cette même radioactivité en fonction de la composition du milieu de culture.

a . Etude du vieillissement de la culture cellulaire

Toutes les cellules utilisées dans cette expérience sont mises en culture en boîtes "pharmacie" dans les conditions habituelles. Aux temps 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120 heures, le milieu de culture est remplacé par du milieu sans phosphore contenant du ^{32}P ($10\mu\text{c/ml}$). Pour chaque point, les durées de marquage ont été de 11 heures et 13 heures. Les surnageants sont recueillis et le virus purifié par la méthode de Moloney, suivie d'un gradient saccharose (60 % - 15 %) à l'équilibre et de la précipitation du RNA par le TCA en présence de SDS. Les comptages de radioactivité ont tous été effectués le même jour. Pour chaque point on a également compté le nombre de cellules.

Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant où l'on a figuré la radioactivité totale incorporée dans les virions et rapportée à 10^7 cellules.

Temps de culture avant marquage	Marquage 11 h cpm	Marquage 13 h cpm
0 h	422	492
12 h	1.222	765
24 h	3.738	5.192
36 h	881	1.910
48 h	2.535	4.120
60 h	2.672	4.000
72 h	1.649	3.834
96 h	666	1.437
120 h	517	927

On peut voir que le maximum de radioactivité est trouvé dans les virions produits par des cellules ayant déjà 24 heures de culture, donc en pleine phase de croissance. Par contre, la radioactivité diminue dans les virions produits par des cellules ayant 36 heures et plus de culture.

Or, pour l'inoculum considéré (10^7 cellules) poussant dans le type de flacon utilisé, la complétion de la monocouche est réalisée dès la 24ème heure. Après ce temps, le rythme mitotique diminue considérablement. On est donc en droit de penser que la diminution de la radioactivité des virions est concomitante à la diminution de la prolifération cellulaire.

b . Etude du rôle du milieu de culture

Un inoculum cellulaire de $3,7 \cdot 10^6$ cellules est mis en culture dans des flacons "pharmacie" de 250 ml dans du milieu normal à l'hydrolysate de caséine contenant 15 % de sérum de veau. Au bout de 24 heures, ce milieu est remplacé par du milieu tampon Tris contenant 15 % de sérum de veau dialysé et du phosphate disodique (10^{-4} M) pour une première série de bouteilles et par du milieu tampon Tris, phosphate disodique (10^{-4} M) sans sérum de veau pour une deuxième série de bouteilles.

Les bouteilles sont vidées puis complétées avec du milieu de chaque sorte contenant du ^{32}P ($10 \mu\text{c/ml}$) aux temps 24, 48, 72 et 96 heures. Le marquage est effectué pendant 11 heures et 13 heures.

La purification virale est réalisée selon la méthode précédemment décrite de Moloney suivie d'un gradient saccharose (60 % - 15 %) à l'équilibre et précipitation du RNA par le TCA en présence de SDS. La radioactivité de tous les échantillons est comptée le même jour. En même temps, un comptage des cellules est effectué pour chaque point de chaque série.

Les résultats sont résumés dans les figures 15 et 16.

Dans la figure 15, exprimant le nombre de cellules en fonction du temps, on peut voir que, comme prévu, l'omission du sérum dans le milieu de culture ralentit considérablement la pousse cellulaire.

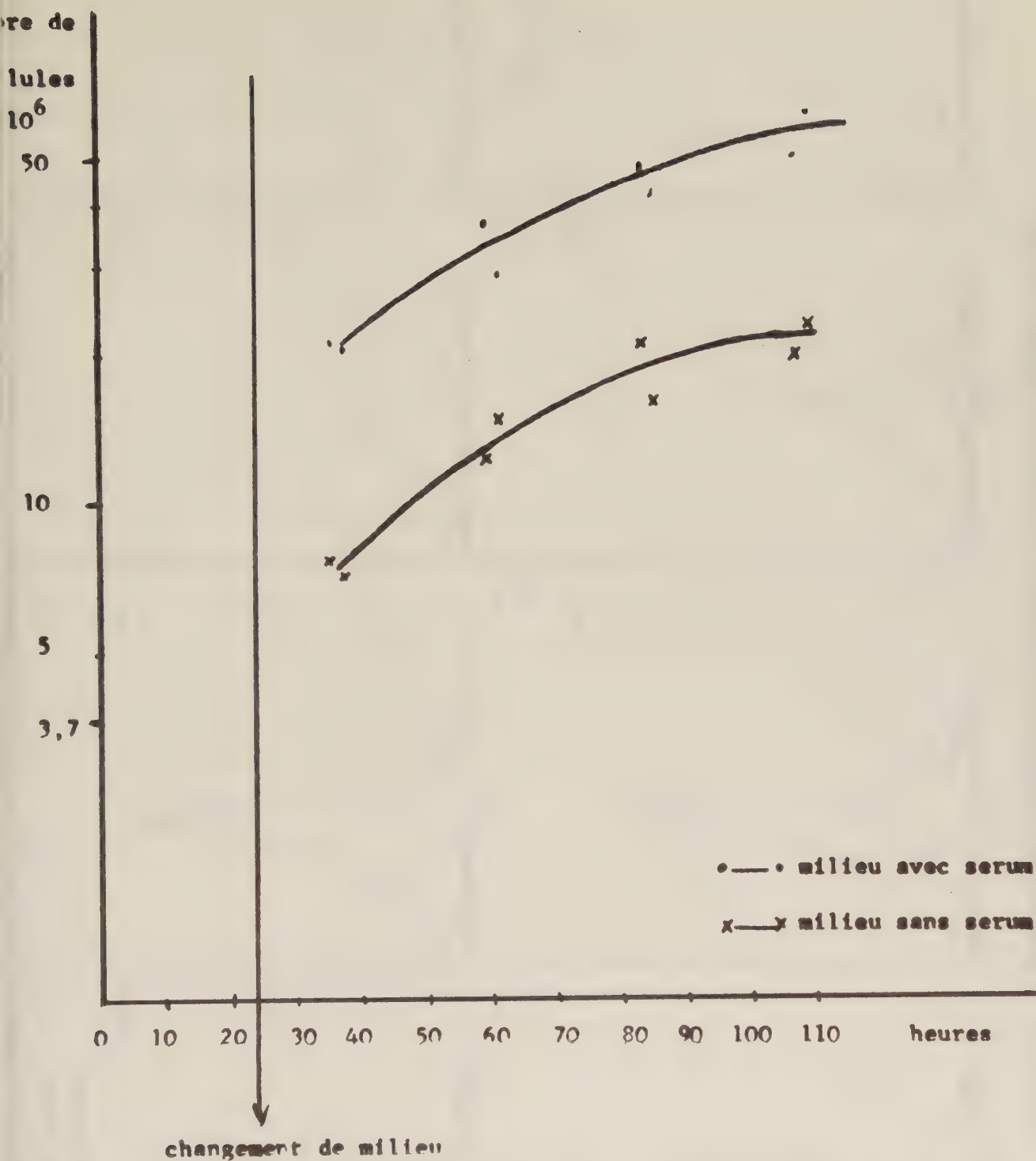


Figure 15 : Multiplication des cellules JLS V5 en présence et en l'absence de sérum de veau dans le milieu de culture

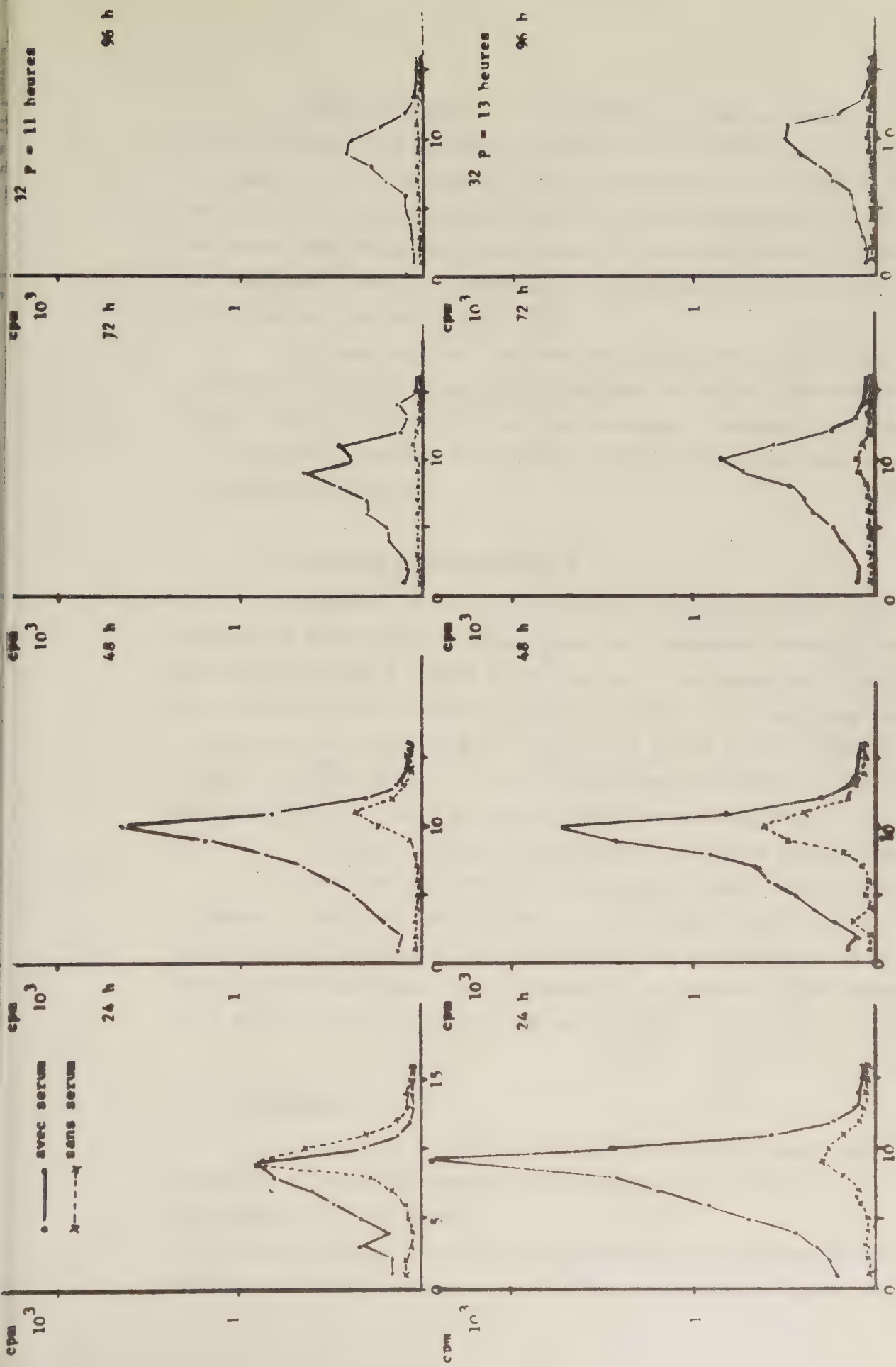


Figure 16 : Radioactivité totale incorporée dans les virions produits par les cellules JLS V5 et rapportée à 10⁷ cellules, en fonction du temps. Marquages de 11 heures et 13 heures au ³²P - 10 μ Ci/ml.

Dans la figure 16, on a exprimé la radioactivité totale incorporée dans les virions, rapportée à 10^7 cellules, en fonction du temps. On voit nettement que l'incorporation de traceurs dans les virions est pratiquement nulle ou très faible dans les cellules cultivées dans du milieu sans sérum. En d'autres termes, il est probable que, dans ces conditions, les cellules ne synthétisent qu'un nombre très petit de virions.

Il apparait donc que des cellules arrêtées dans leur croissance, soit parce que cultivées dans un milieu dépourvu de sérum, soit parce qu'elles sont excessivement nombreuses par rapport à la surface du support cellulaire, sont inhibées dans leur capacité à produire des virions.

D - Effets de l'Actinomycine D

L'influence de l'actinomycine D a été étudiée. Dans les conditions habituelles, les cellules sont marquées pendant 2 heures avec de l'uridine 3 H dans le milieu, puis une chasse de 13 heures est effectuée avec un nouveau milieu contenant de l'actinomycine D à des doses variables ($0\text{ }\mu\text{g}$ - $0,1\text{ }\mu\text{g}$ - et $0,5\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$) et de l'uridine froide (5.10^{-3} M). Avec le virus extrait des surnageants, des gradients SDS sont réalisés selon la méthode précédemment décrite.

La figure 17 montre les résultats de cette expérience.

Alors que l'on détecte facilement le RNA viral lourd en l'absence d'actinomycine, (graphique A), on peut voir que la radioactivité incorporée au niveau de ce pic est diminuée en présence de $0,1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ d'actinomycine (graphique B) et devient nulle lorsque la dose d'actinomycine utilisée est de $0,5\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$.

III - CONCLUSIONS

L'étude de l'incorporation de traceurs radioactifs, ^{32}P et uridine 3 H , dans les virions extracellulaires produits par la lignée cellulaire JLS V5 a permis :

a) de préciser l'influence du support de la croissance cellulaire. Les résultats ont montré une sortie des virions plus rapide lorsque

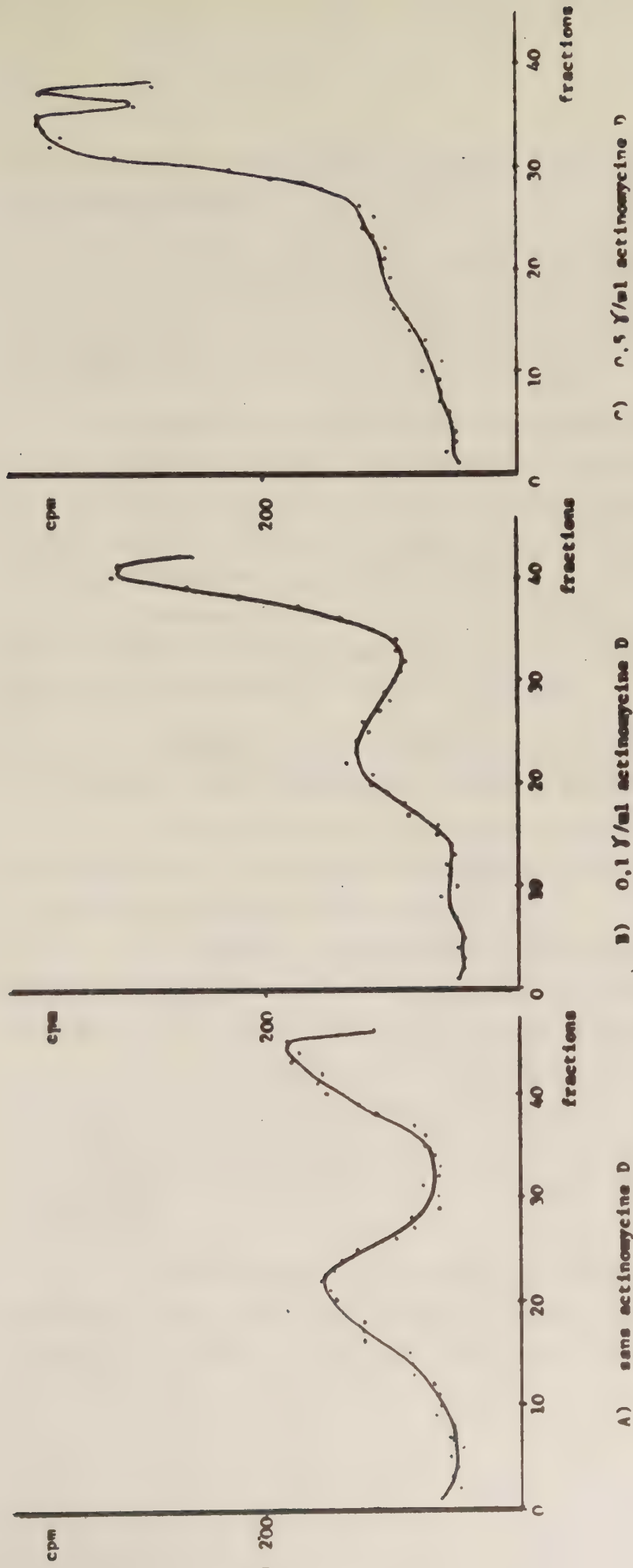


Figure 17 : Effets de l'actinomycine D sur l'incorporation d'uridine marquée dans le RNA viral extracellulaire.
 Marquage des cellules JLS V5 pendant 2 heures à l'uridine ^3H
 Chasse de 13 heures en présence d'actinomycine D à des doses variables et d'uridine $5 \cdot 10^{-3}$ M.
 Gradients SDS 0,4 % - 20 % - 5 % saccharose 25.000 t/mn pendant 3 heures à $+20^\circ\text{C}$.

les cellules sont cultivées sur plastique que lorsqu'elles sont cultivées sur verre

b) d'établir la cinétique de cette incorporation et de voir en particulier qu'elle est de type exponentiel. Le début de la sortie pour des cellules croissant sur plastique se produit vers 1 h 30, la quantité maximum de virions obtenue se situant 8 h 30 après.

c) d'établir une relation entre l'activité mitotique cellulaire et la production virale : il est nécessaire que les cellules soient en croissance active pour produire le virus. Inversement, des cellules JLS V5 cultivées en milieu sans sérum montrent une production virale pratiquement nulle après 48 heures de séjour dans ce milieu.

De même, la production virale diminue au fur et à mesure de la complétion de la monocouche cellulaire, entraînant une baisse puis une suppression de l'activité mitotique.

d) de démontrer que l'incorporation de traceur dans les virions est supprimée par l'actinomycine D, même à faibles doses.

L'interprétation des résultats obtenus par l'incorporation de traceurs dans les virions extracellulaires doit cependant tenir compte de deux réserves importantes :

a . Lorsque l'incorporation est diminuée, la méthode ne permet pas de discriminer s'il s'agit d'un blocage de la sortie du virus ou d'une diminution vraie des néo-synthèses virales.

b . La sensibilité à l'actinomycine D peut être due, soit à une action de l'antibiotique sur la synthèse du RNA viral, soit à une autre action, par exemple sur la synthèse des protéines virales et/ou cellulaires qui empêcherait le virion de se constituer normalement.

C'est pour tenter de surmonter ces incertitudes et ces difficultés que nous avons essayé d'étudier directement la biosynthèse du RNA viral dans la cellule, ce qui va constituer le Chapitre III de ce travail.

CHAPITRE III

REPLICATION VIRALE SUIVIE PAR L'INCORPORATION DE TRACEURS

DANS LE RNA VIRAL INTRACELLULAIRE

L'étude de la replication virale intracellulaire se heurte à deux problèmes principaux.

Tout d'abord il y a très peu de RNA viral (RNA 70 S "lourd") dans la cellule, aussi l'extraction et la purification de ce RNA ne peuvent se faire que par enrichissements successifs de la région lourde.

De plus nous ne connaissons pas de marqueur spécifique du RNA viral, si ce n'est, pour l'instant, sa constante de sédimentation spécifique de 70 S qui peut d'ailleurs varier entre 65 et 75 S selon la température de centrifugation et la force ionique et qui peut être confondue avec certains RNA lourds cellulaires.

I - METHODES

A - Extraction des RNA à partir de cellules JLS V5

Les cellules JLS V5 sont ensemencées comme décrit précédemment en présence de milieu à l'hydrolysate de caséine dans du tampon phosphate additionné de 15 % de sérum de veau. Au bout de 24 heures lorsque les cellules sont en pleine phase exponentielle de croissance et que la monocouche est presque continue, on change le milieu de culture par du milieu caséine tampon Tris, c'est-à-dire pratiquement sans phosphore, additionné de 10 μ c/ml de 32 P.

On laisse en contact un laps de temps déterminé, on jette le milieu puis on recueille les cellules par trypsinisation. Celles-ci sont ensuite centrifugées à basse vitesse pendant 10 minutes, puis rincées deux fois avec du milieu sans phosphore à froid (4°C), pour bien éliminer la trypsine. Les cellules sont alors pesées et gardées dans

de la carboglace (-70°C) jusqu'à l'extraction qui a lieu en général le lendemain.

1°) Extraction

Les cellules sont décongelées assez rapidement, on ajoute 10 ml par gramme de cellules d'acétate de sodium (0,02 M pH 5) et enfin elles sont homogénéisées dans un homogénéiseur de Thomas. On ajoute alors du SDS à 4 % pour avoir une concentration finale 0,4 % et l'on procède comme décrit plus haut dans le chapitre I de ce travail.

Après précipitation et lavages des RNA cellulaires, on égoutte bien le culot et on le dissout dans 3 ml de tampon acétate de sodium 0,01 M NaCl 0,1 M.

2°) Gradients

Deux techniques ont été utilisées : la première faisant intervenir 3 gradients successifs 20 % - 5 % dont le premier comporte une couche 50 % saccharose, l'autre faisant intervenir 3 gradients successifs 30 % - 15 % saccharose.

Le tampon de dissolution des RNA cellulaires sert à préparer des solutions de saccharose purifié à 5 %, 20 %, 50 % d'une part, 30 %, 15 % d'autre part.

a . Gradients 20 % - 5 %

Un aliquot de la solution de RNA extrait des cellules JLS V5 est déposé sur un tube de gradient SW 25 20 % - 5 % de saccharose formé au-dessus d'une couche de 5 ml de saccharose 50 %.

Les RNA lourds, après une centrifugation de 6 heures à 25.000 tours par minute (rotor Spinco SW 25) sédimentent dans la couche 50 % ce qui permet de les séparer des RNA cellulaires 28, 16 et 4 S qui sédimentent au-dessus dans le gradient linéaire 20 % - 5 % (figure 18A).

Après centrifugation, on recueille le gradient par fractions, un aliquot de chacune d'elles est alors prélevé pour mesure de la

radioactivité en scintillation liquide. La partie lourde est ensuite reprise et les RNA qu'elle contient reprécipités en présence de RNA froid cellulaire par de l'alcool absolu en milieu NaCl 0,1 M. Le précipité obtenu est dissout dans le tampon habituel et soumis à un nouveau gradient (20 % - 5 % saccharose).

Après centrifugation de 3 h 30 à 25.000 t/mn (SW 25 Spinco) et mesure de la radioactivité, on obtient un pic plus ou moins homogène (figure 18B) et les tubes lui correspondant sont utilisés de la façon suivante : on reprécipite de nouveau le RNA de ce pic toujours en présence de RNA froid cellulaire servant d'entraîneur. Le précipité est de nouveau dissout puis soumis à un troisième gradient 20 % - 5 % de saccharose pour lequel on procède comme précédemment.

Le troisième gradient donne un pic net (figure 18C).

b . Gradients 30 % - 15 %

La manière de procéder est la même mais les RNA cellulaires sont soumis à trois gradients successifs 30 % - 15 % de saccharose (rotor Spinco SW 25) 6 heures, 25.000 tours/mn à + 4°C.

B - Méthodes de séparation des constituants cellulaires

Les cellules sont marquées et recueillies selon la méthode habituelle et les constituants cellulaires séparés selon la méthode de Penman (1966).

1°) Préparation de la fraction cytoplasmique

Les cellules sont homogénéisées dans un tampon hypotonique RSB (Reticulocytes Suspension Buffer) à pH 7,4 comportant du Tris 10^{-2} M, NaCl 10^{-2} M, Mg Cl₂ 15.10^{-4} M à raison de 1 ml par boîte de Roux de cellules recueillies et laissées 10 mn en contact, puis broyées dans un homogénéiseur type Dounce de façon à faire éclater les cellules sans broyer les noyaux.

On centrifuge le produit du broyat, à froid, à 3.500 tours pendant 4 mn (Sorvall).

Le surnageant est recueilli, le culot est resuspendu dans du RSB à volume égal puis recentrifugé dans les mêmes conditions. On conserve le culot pour la préparation nucléoplasmique (cf paragraphe suivant). Les deux surnageants sont regroupés et constituent la fraction cytoplasmique que l'on débarrasse des débris nucléaires par cinq centrifugations successives de 4 mn à 3.500 t/mn.

Le volume A de surnageant ainsi purifié est additionné de 2 gouttes de PVS (3.000 γ /ml) et mélangé à volume égal avec du tampon EDTA 6.10^{-3} M et complété par un volume A/5 de SDS à 5 %.

On laisse à la température du laboratoire. Après éclaircissement de la solution on procède à l'extraction des RNA (au phénol et à froid) selon la méthode décrite au début de cette troisième partie.

2°) Préparation de la fraction nucléoplasmique

Le culot gardé est repris et débarrassé des débris cytoplasmique et mitochondriaux éventuels par la méthode suivante : On resuspend celui-ci dans un tampon RSB (avec précaution pour éviter l'éclatement des noyaux) puis on centrifuge l'ensemble à basse vitesse (3.500 t/mn à froid). Ceci est répété trois fois, la propreté de la préparation est vérifiée au microscope à contraste de phase. Lorsque celle-ci est jugée satisfaisante, on ajoute au culot de centrifugation 2 ml de tampon HSB (High Salt Buffer) de haute molarité ($\text{NaCl } 5.10^{-1}$ M, $\text{Mg Cl}_2 \text{ } 5.10^{-2}$ M, $\text{Tris } 10^{-2}$ M).

Le culot devient très visqueux. On ajoute alors de 80 à 150 γ de DNase qui détruit le DNA en laissant intacts les RNA nucléaires à condition que l'action soit rapide. On plonge immédiatement le tube dans un bain marie à 37°C pendant 5 à 10 mn en agitant avec un petit agitateur de verre jusqu'à ce que la viscosité disparaisse.

Dès qu'il en est ainsi, la préparation est refroidie dans de la glace pilée.

On centrifuge à froid pendant 5 mn à 10.000 t/mn. On garde le culot pour la préparation de la fraction nucléolaire (cf paragraphe suivant).

On prélève les 2 ml de surnageant constituant la fraction nucléoplasmique auxquels on ajoute 1 goutte de PVS et un volume identique d'EDTA 0,2 M. Aux 4 ml ainsi obtenus on ajoute 16 ml d'un mélange à parties égales de RSB et d'EDTA 6.10^{-3} M, environ 800 χ de RNA froid cellulaire servant d'entraîneur et 2 ml de SDS 5 %.

On a donc au total 22 ml que l'on laisse à la température du laboratoire. La solution devient translucide et l'extraction des RNA est alors effectuée comme indiqué précédemment.

3°) Préparation des nucléoles

Le culot conservé provenant de la centrifugation après action de la DNase est constitué principalement par les nucléoles. Une goutte de PVS est ajoutée ainsi que 20 ml d'un mélange à parties égales de RSB et d'EDTA 6.10^{-3} M et enfin 2 ml de SDS 5 %.

L'ensemble est laissé à la température du laboratoire, puis on effectue l'extraction selon la méthode précédemment décrite.

Enfin chacun des constituants est soumis aux trois gradients décrits dans le chapitre méthodes (avec couche 50 % saccharose pour le premier de ces gradients).

II - RESULTATS

A - Mise en évidence d'un RNA lourd 70 S intracellulaire

1) Extraction de ce RNA à partir de cellules JLS V5 entières

Après un marquage court (2 heures) ou un marquage long (24 heures) nous pouvons observer après trois gradients successifs un pic net dont la constante de sédimentation est de 70 S (figure 18).

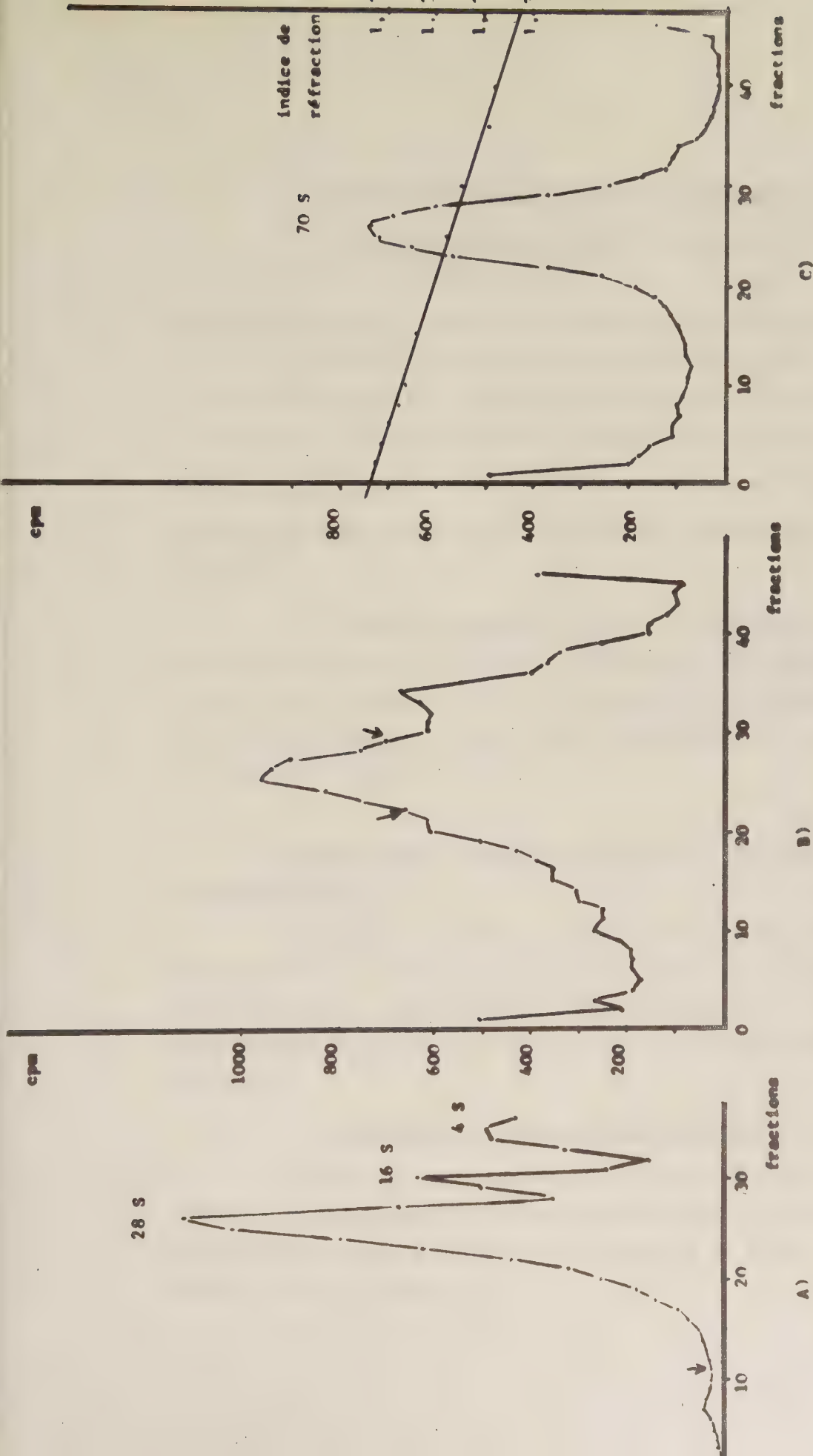


Figure 18 : Extraction du RNA "lourd" 70S à partir de cellules JLS V5

A) Gradient 50 % - 20 % - 5 % saccharose 6 heures à 25.000 U/mn à + 4°C

La phase lourde (entre les flèches) est reprise et recentrifugée.

B) En gradient 20 % - 5 % saccharose - 3 h 30 à 25.000 U/mn à + 4°C.

On reprend la zone située entre les flèches et on refait un 3ème gradient

C) Gradient 20 % - 5 % saccharose - 3 h 30 - à 25.000 U/mn à + 4°C.

2) Extraction de ce RNA après fractionnement cellulaire

a . Après un marquage court (2 heures au ^{32}P , $20 \mu\text{c/ml}$) (figure 19) nous pouvons voir que

dans le cytoplasme : malgré des expériences répétées nous n'avons pu noter la présence d'un RNA susceptible de représenter celui envisagé dans l'expérimentation précédente encore qu'il faille remarquer l'existence d'une radioactivité polydisperse non caractéristique.

dans le nucléoplasme : nous ne trouvons pas de pic 70 S

dans le nucléole par contre, nous pouvons observer un pic 70 S très net.

b . Après un marquage long au ^{32}P ($10 \mu\text{c/ml}$) pendant 24 heures, nous pouvons observer (figure 20) la présence de RNA lourds dans le noyau et dans le cytoplasme ; en particulier, le RNA 70 S cytoplasmique est parfaitement cosédimenté avec le RNA viral de surnageant de cellules JLS V5.

B - Preuves selon lesquelles ce RNA 70 S intracellulaire est d'origine virale

En effet, une sédimentation à 70 S est insuffisante en soi pour prouver que ce RNA est bien un RNA viral car il est possible (Warner et Col., 1966) d'extraire des RNA lourds de cellules non productrices de virus. Les preuves que nous présentons sont les suivantes :

1°) Coefficient de sédimentation = 70 S

Comme nous avons pu le voir, il y a cosédimentation parfaite du RNA extrait à partir de cytoplasme de cellules JLS V5 avec le RNA extrait à partir des surnageants de culture de ces mêmes cellules (figure 20).

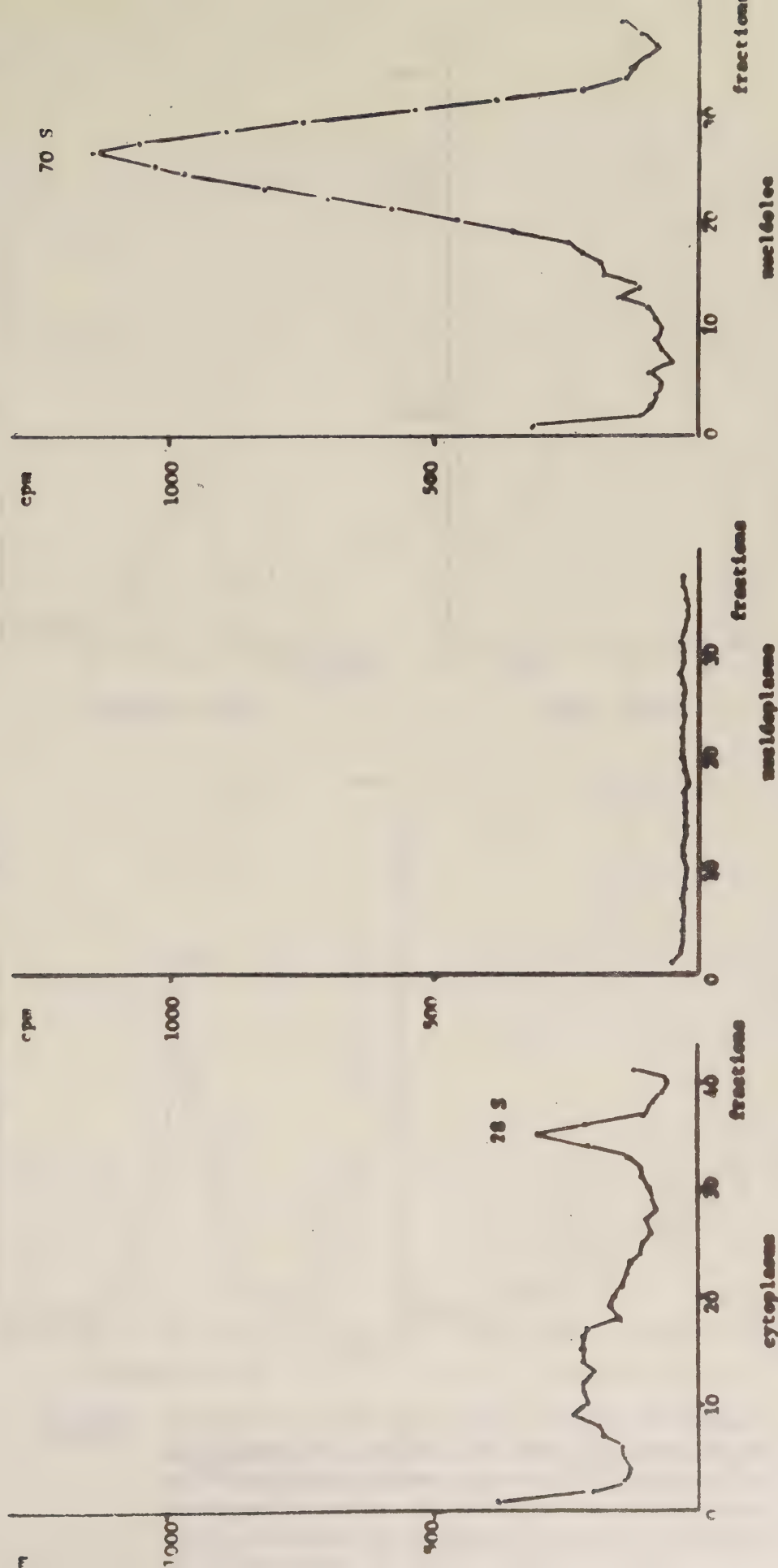


Figure 19 : Recherche d'un RNA lourd "70S" au niveau de différents constituants de la cellule JLS V5, après marquage court de 2 heures au ^{32}P (20 $\mu\text{C}/\text{ml}$) et 3 gradients successifs.

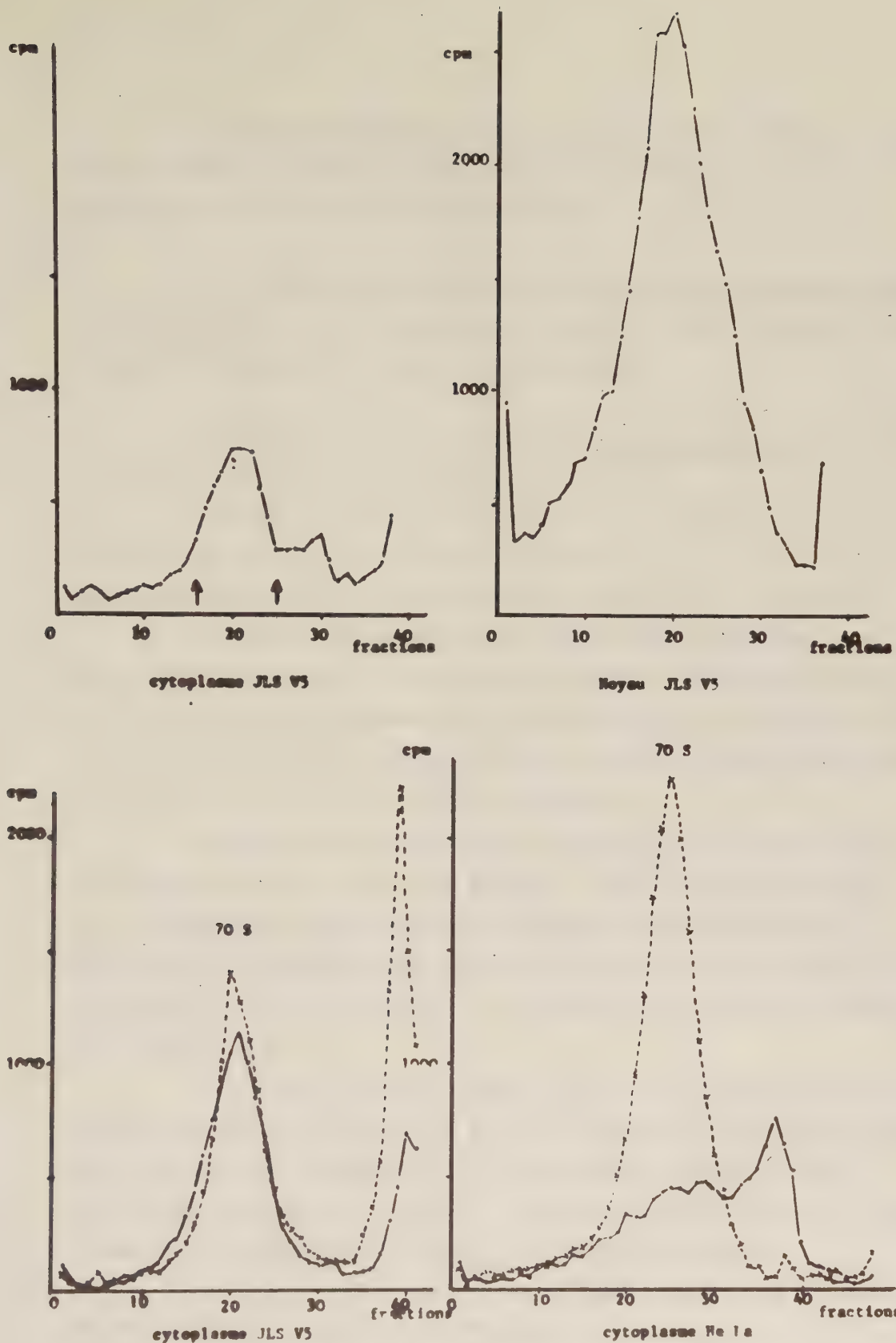


Figure 20 : Recherche d'un RNA lourd "70S" au niveau de différents constituants de la cellule JLS V5. après marquage long (24 heures) au ^{32}P ($10\mu\text{c/ml}$)-cosédimentation d'un RNA viral extrait de surnageant de cellules JLS V5 marqué à l'uridine ^3H (x- - - - x) avec le RNA extrait de cytoplasme de cellules JLS V5 et de cellules HeLa (- — -) pendant le 3ème gradient.

2°) La localisation cytoplasmique après un marquage long est en faveur d'un RNA de type viral car les RNA lourds de type cellulaire sont localisés dans le noyau.

3°) D'autre part l'absence d'un RNA cytoplasmique de même type extrait à partir de cellules HeLa traitées de façon parallèle à JLS V5, (figure 20) apporte une preuve supplémentaire.

4°) Nous avons voulu utiliser l'actinomycine D pour préciser la nature du RNA que nous avons mis en évidence.

On sait que l'actinomycine bloque la transcription des RNA cellulaires, mais si tous les RNA cellulaires sont bloqués les doses efficaces sont variables selon l'espèce moléculaire considérée.

C'est ainsi que des doses faibles d'actinomycine, de l'ordre de 0,1 μ g/ml bloquent la transcription des RNA ribosomiaux (45 S) et donc par voie de conséquence, les RNA 28 S et 16 S, alors qu'il faut des doses nettement plus élevées (plusieurs μ g/ml) pour bloquer la transcription de tous les RNA messagers.

Comme les RNA cellulaires les plus gênants pour la mise en évidence du RNA du virus de Rauscher sont les RNA ribosomiaux, car ils sont en grande quantité, que leurs précurseurs ont un coefficient de sédimentation élevé (45 S) et que leur origine est nucléolaire, nous avons étudié la synthèse du RNA 70 S en présence d'actinomycine D.

a . dans un premier temps, nous avons vérifié l'effet de doses variables d'actinomycine D sur la synthèse des RNA ribosomiaux. Les cellules sont marquées au ^{32}P (20 μ Ci/ml) en présence de : 0 μ g - 0,1 μ g - 0,3 μ g - 0,5 μ g - 0,8 μ g - 1 μ g par ml d'actinomycine D, pendant 4 heures, 15 minutes après l'addition de l'antibiotique.

Les RNA cellulaires totaux ont été extraits et la radio-activité déterminée après des gradients saccharose 20 % - 5 %

(18 heures, 20.000 tours par minute),

Le tableau suivant résume les résultats ainsi que la figure 21

Am D	28 S	16 S	4 S
0 γ	+	+	+
0,1 γ	-	-	+
0,3 γ	-	-	+
0,5 γ	-	-	$\pm$
0,8 γ	-	-	-
1 γ	-	-	-

b . Comme pour des doses de 0,1 γ - 0,3 γ - 0,5 γ , la synthèse des RNA ribosomiaux apparaît être complètement inhibée, nous avons recherché dans ces conditions si le RNA du virus de Rauscher, pouvait être extrait ou non. La figure 22 nous montre la présence d'un pic 70 S pour la dose de 0,1 γ /ml d'actinomycine D, mais au fur et à mesure que les doses d'antibiotique augmentent, l'importance du pic diminue.

Dans une autre expérience, nous avons employé une dose de 5 γ /ml d'actinomycine et nous ne trouvons plus du tout de RNA 70 S.

5°) Stabilité métabolique

Les RNA cellulaires lourds sont relativement peu stables. Par contre le RNA du virus de Rauscher doit être plus stable dans la mesure où le virus radioactif ne sort pas avant 5-6 heures. (cultures sur verre).

La stabilité métabolique a été testée par des expériences de chasse, soit simple, soit en présence d'actinomycine.

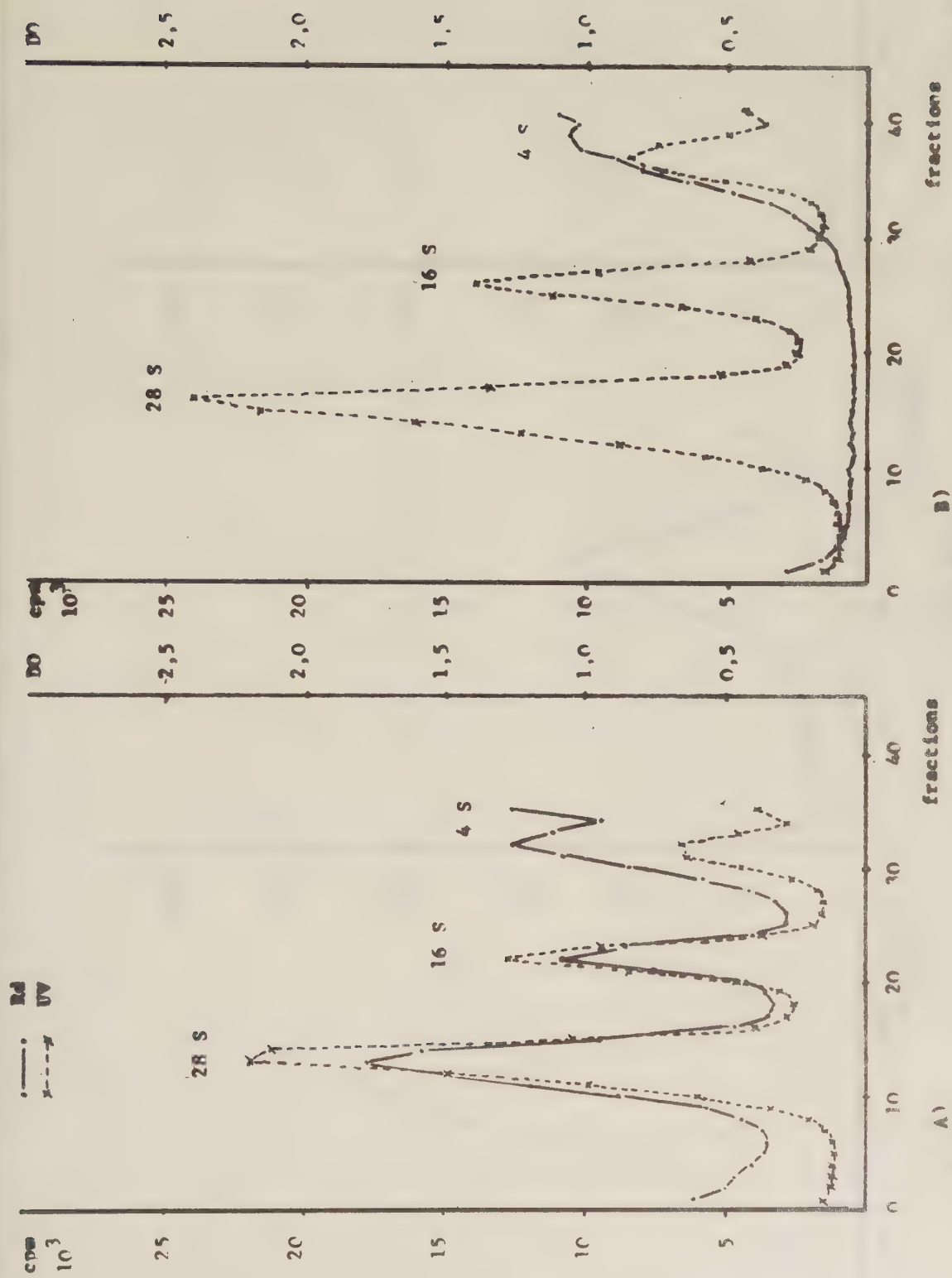


Figure 21 : Action de l'actinomycine D sur la synthèse des RNA ribosomiaux de la cellule JLS V5.
 A) Marquage 4 heures au ^{32}P (20 $\mu\text{C}/\text{ml}$) sans actinomycine D.
 B) Marquage 4 heures au ^{32}P (20 $\mu\text{C}/\text{ml}$) en présence de 0,1 γ/ml d'actinomycine D.
 Centrifugation 18 heures à 20.000 t/mn en gradient 20 % - 5 % saccharose.

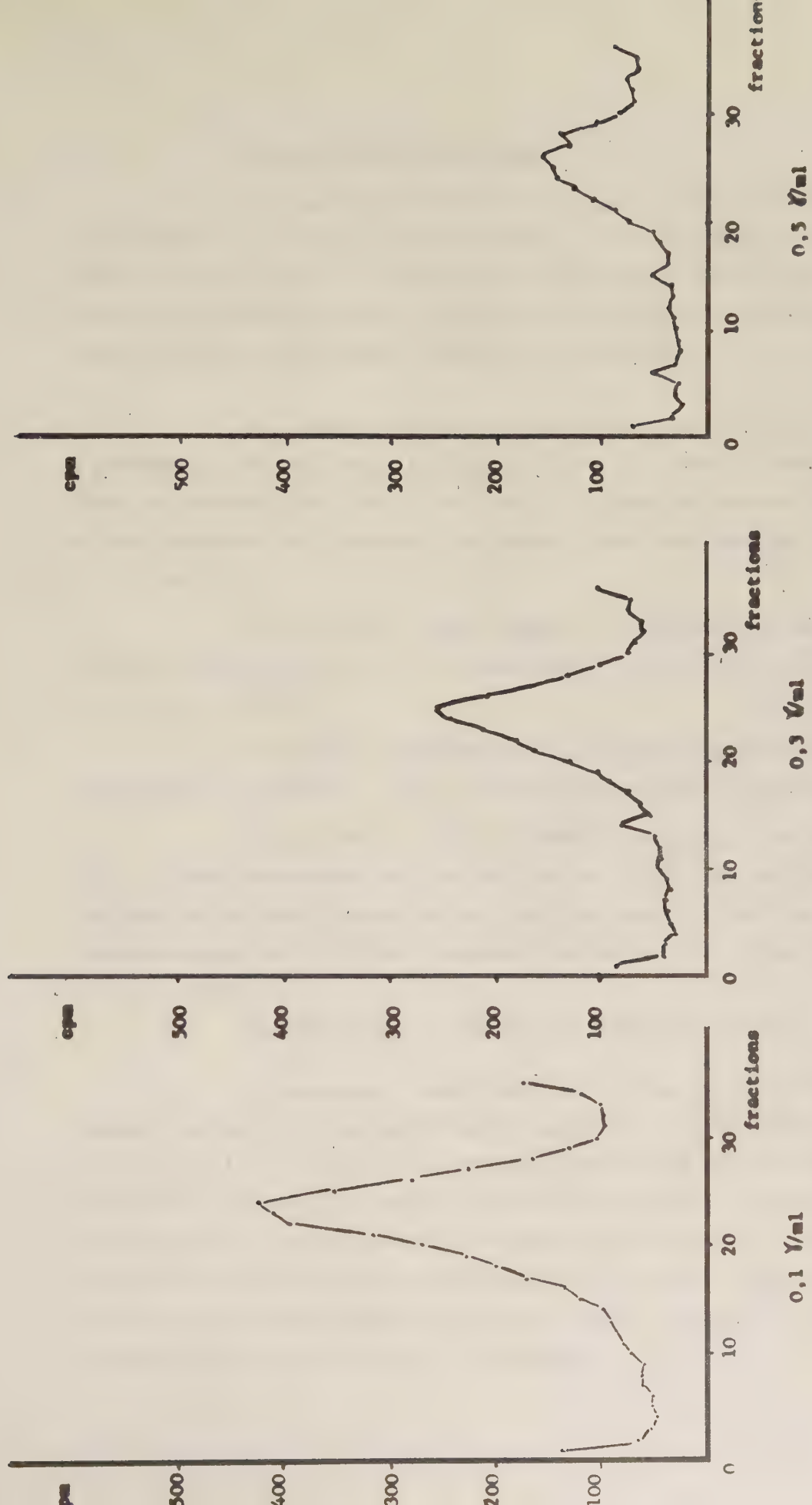


Figure 22 : RNA "lourd" extrait des cellules JLS V5 marquées pendant 4 heures au ^{32}P ($20 \mu\text{Ci/ml}$) en présence de 0,1 Y/ml - 0,3 Y/ml - 0,5 Y/ml d'actinomycine D ap rès le deuxième gradient 20 % - 5 % saccharose, 3 h 30 à 25.000 t/mn à $+4^\circ\text{C}$.

1 - Chasses sans actinomycine

a . Après une heure de marquage au ^{32}P , on effectue une chasse de 3 heures en milieu normal. Les résultats sont exprimés dans la figure 23 où l'on peut voir un RNA lourd, extrait des cellules entières JLS V5 et un RNA lourd, légèrement décalé par rapport au RNA viral témoin, dans les cellules HeLa.

b . Nous avons repris les cellules provenant de l'expérience décrite dans le Chapitre II de ce travail, recueillies après un marquage de 5 mn à l'uridine 3 H, suivi de chasse avec un milieu contenant de l'uridine, cytidine, thymidine, pendant 45 mn, 1 h 15 et 1 h 45.

Nous avons à chaque gradient cosédimenté du RNA viral marqué 48 heures avec du ^{32}P et provenant de surnageant de culture de cellules JLS V5.

Nous avons effectué trois gradients successifs 30 % - 15 % saccharose (25.000 t/mn, rotor Spinco SW 25 pendant 6 heures).

Comme témoin, dans les mêmes conditions, nous avons fait la même expérience avec la cellule en lignée continue HeLa car les RNA cellulaires lourds de cette cellule ont été très bien étudiés antérieurement par différents auteurs (Warner et Col., 1966, Attardi et Col., 1966).

La figure 24 représente les résultats obtenus.

On remarque l'excellente définition du pic de radioactivité dessiné par le RNA viral cosédimenté (marqué sur le phosphore). Le pic principal de radioactivité des RNA extraits de la cellule par cette méthode est décalé par rapport au premier (constante de sédimentation correspondant à la radioactivité maximum voisine de 50 S), mais on observe dans tous les cas un épaulement plus ou moins important vers 70 S, ce qui laisse présumer l'existence, dans l'extrait, d'un RNA du même type que ceux qui sont cosédimentés.

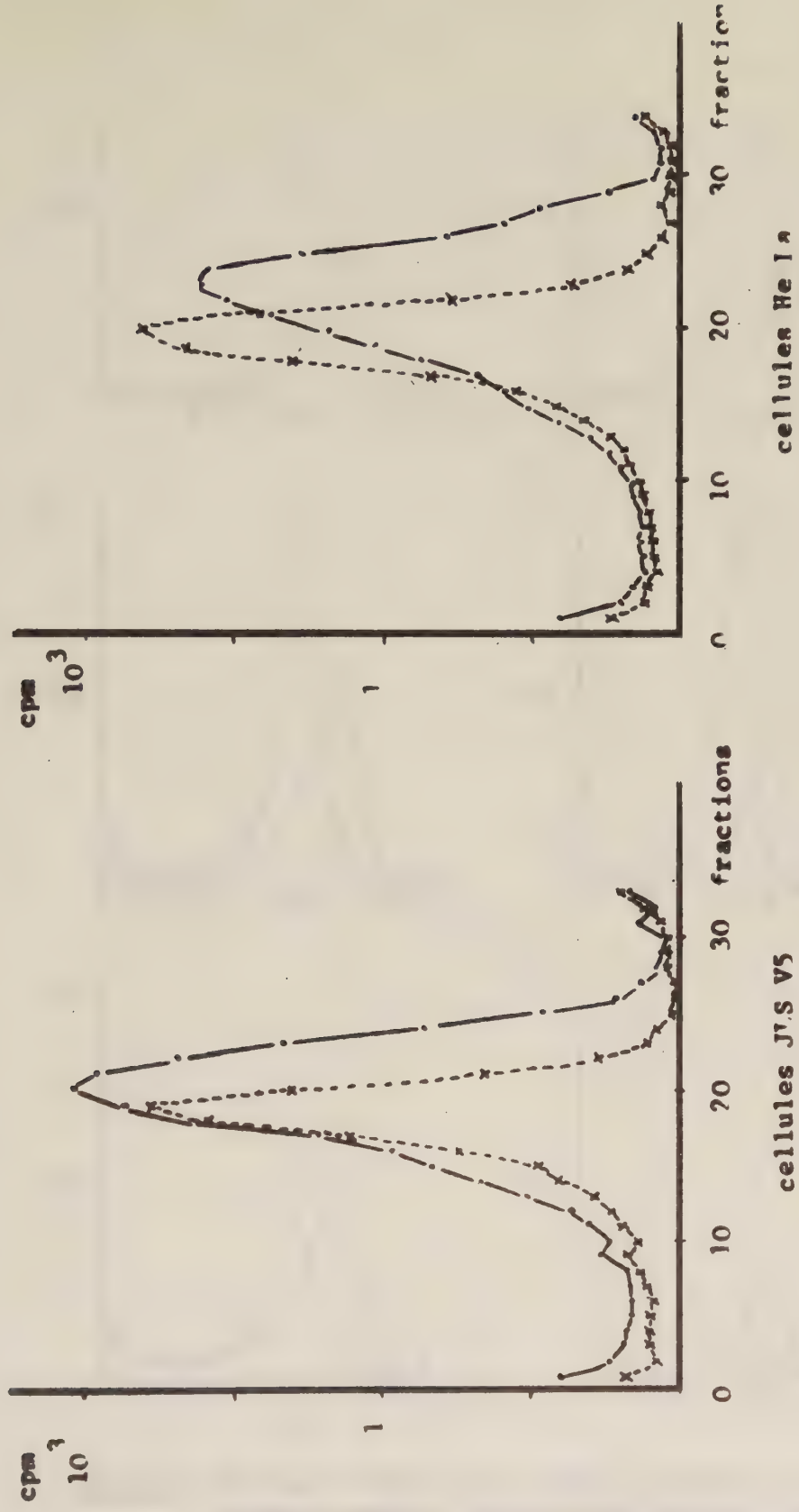


Figure 23 : RNA "lourd" extrait de cellules JLS V5 et HeLa après marquage au ^{32}P pendant 1 heure suivi d'une chasse de 3 heures en milieu normal.
 x-----x RNA viral cosédimenté extrait de surnageant de cellules JLS V5 (marqué à l'uridine ^3H)
 •-----• RNA lourd extrait des cellules après le 3ème gradient

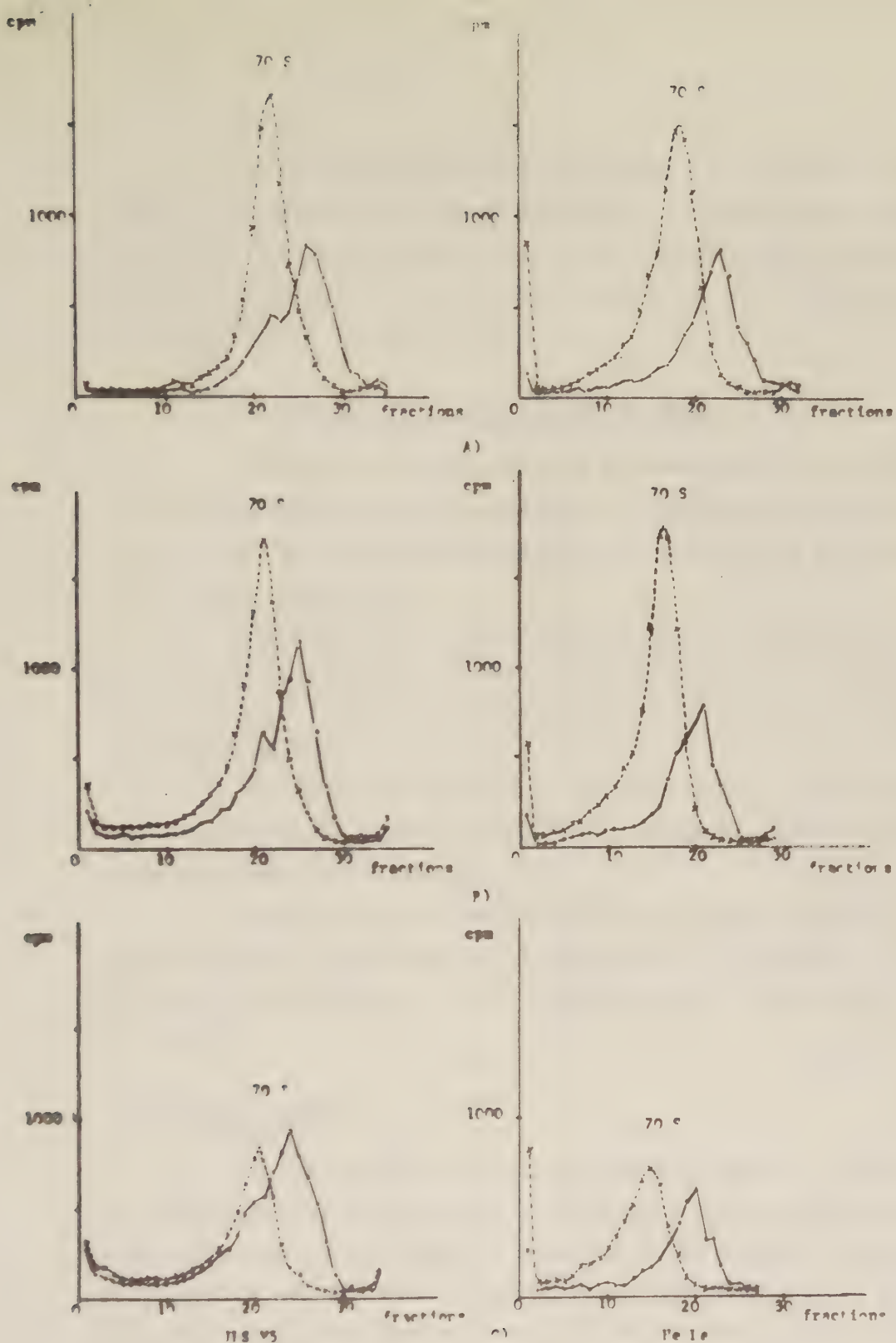


Figure 24 : RNA "lourd" extrait après 3 gradients successifs 30 % - 15 % saccharose pendant 6 heures à 25.000 t/mn à + 4°C de cellules JLS V5 et HeLa marquées pendant 5 mn à l'uridine ^3H et chasse de

A) 45 mn

B) 1 h 15

C) 1 h 45

x-----x RNA viral cosédimenté marqué au ^{32}P

•————• RNA extrait des cellules.

La cellule témoin utilisée (HeLa), non infectée par le virus de la leucémie murine de Rauscher, ne donne jamais lieu à cet épaulement caractéristique. Ceci nous conduit à penser que dans l'extrait effectué sur JLS V5, cet épaulement peut correspondre à des RNA lourds de type viral.

2 - Chasse en présence d'actinomycine

Toutefois les chasses sans actinomycine sont peu efficaces car l'incorporation continue malgré le changement de milieu et cela à cause des pools intermédiaires de nucléotides qui sont relativement importants.

C'est pourquoi nous avons fait de nouvelles expériences, mais en ajoutant pendant la période de chasse de l'actinomycine à raison de 5 μ /ml. Dans ces conditions, toute nouvelle synthèse de RNA est arrêtée.

La figure 25 nous montre les résultats. Nous voyons qu'il persiste un pic 70 S dans les cellules JLS V5 alors qu'il n'y a aucun pic dans la cellule HeLa.

Les résultats obtenus nous montrent que ce RNA 70 S a une stabilité métabolique très supérieure à la plupart des RNA lourds cellulaires, ce que nous attendions d'un éventuel RNA viral.

III - CONCLUSIONS

Il nous semble que les arguments apportés : coefficient de sédimentation, localisation cytoplasmique après un marquage long, synthèse encore possible avec des doses faibles d'actinomycine et stabilité métabolique, suggèrent très fortement que le RNA 70 S que nous avons isolé des cellules JLS V5 est bien le RNA viral.

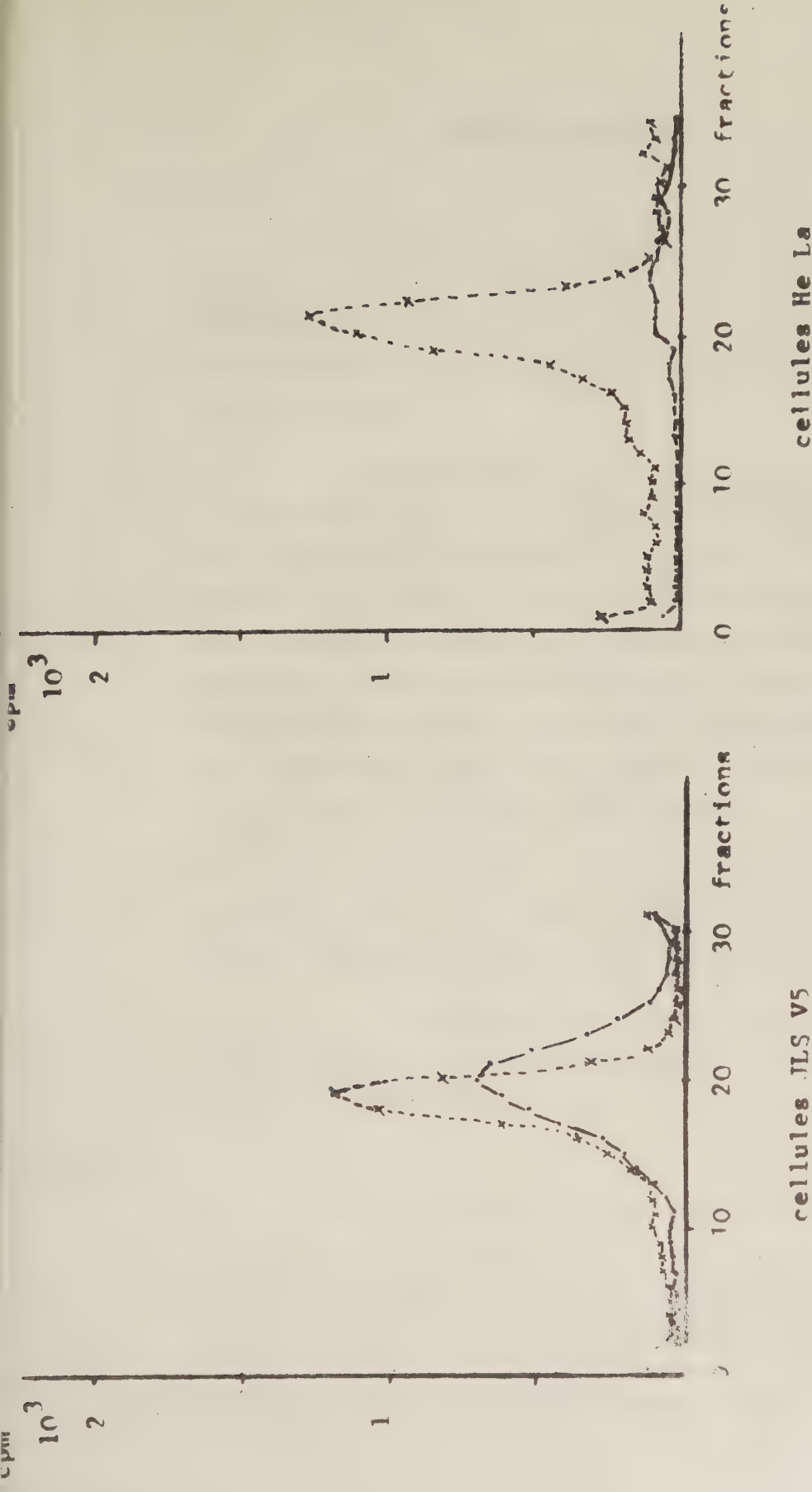


Figure 25 : RNA "lourd" extrait de cellules JLS V5 et HeLa après marquage au ^{32}P pendant 1 heure suivi d'une chasse de 3 heures avec un milieu contenant 5 $\mu\text{g/ml}$ d'actinomycine D.

x-----x RNA viral cosédimenté extrait de surnageant de cellules JLS V5 (^3H uridine)

..... RNA lourde extrait des cellules après le 3ème gradient

DISCUSSION GENERALE

Les résultats qui viennent d'être exposés, bien qu'ils ne permettent pas de dresser un tableau complet et cohérent de la réplication de l'acide ribonucléique du virus de Rauscher dans la cellule, apportent d'intéressantes précisions sur les modalités de cette réplication.

a) Après pénétration du virus dans la cellule et décapsidation, le RNA viral commence à se dupliquer. Où se fait cette duplication ? Les résultats que nous avons obtenus (pages 37, 38) semblent bien montrer que le RNA viral semble être synthétisé dans le nucléole, ou tout au moins les préparations nucléolaires l'entraînent, comme le démontrent les extractions faites après 2 heures de marquage. Ce point capital mériterait peut-être d'être confirmé par des expériences plus nombreuses. Nous devons cependant signaler que, dans un essai non cité dans cette Thèse, après marquage de 3 heures à l'uridine-³H et addition d'actinomycine 0,1 μ /ml, suivis d'une chasse de 4 h³⁵ à l'Am D et l'uridine, nous avons pu extraire de la fraction nucléolaire de cellules JLS V5 un pic de RNA lourd (figure 26) migrant de façon presque identique en gradient avec le RNA viral.

b) Il est probable qu'ensuite le RNA viral migre de la région nucléolaire vers le cytoplasme, d'où il est possible de l'extraire, comme le démontrent nos résultats, si le temps de marquage est plus long.

c) Le RNA viral, une fois encapsidé, sort de la cellule en tant que constituant du virion. Les résultats que nous apportons fournissent quelques éléments sur la cinétique de cette sortie. Les premières molécules de RNA viral marqué sortent dans le milieu extracellulaire 1 h 30 (cellules poussant sur plastique) ou 4 h 30 (cellules poussant sur verre) après un marquage court. La courbe

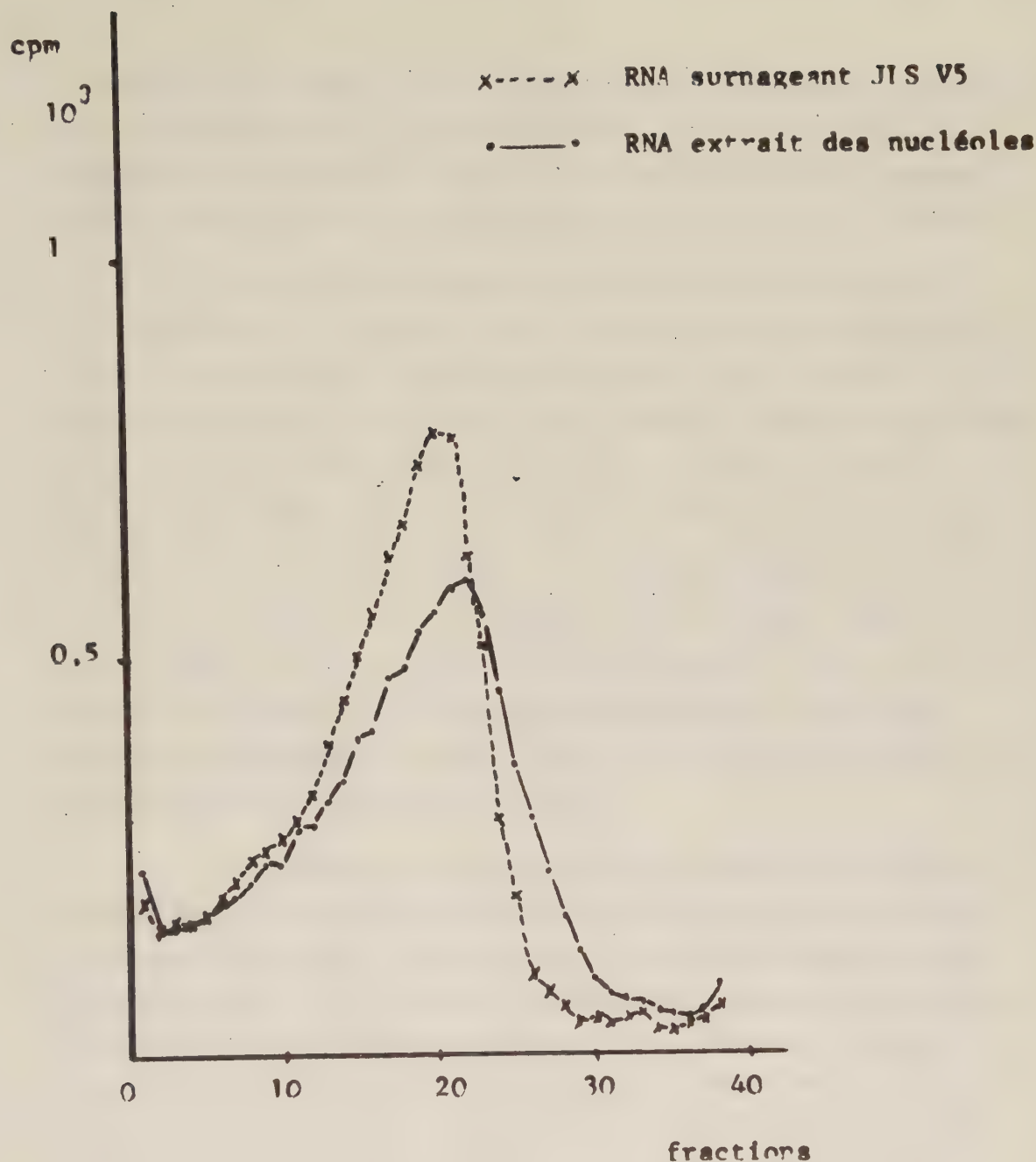


Figure 26 : RNA "lourd" extrait de la fraction nucléolaire de cellules JLS V5 après marquage de 3 heures à l'uridine ^3H en présence de $0,1 \mu\text{g/ml}$ d'actinomycine suivi d'une chasse de 4 h 35 à l'uridine en présence de $0,1 \mu\text{g/ml}$ d'actinomycine.

cumulative de la radioactivité présente dans les virions extracellulaires est une exponentielle, ce qui indique que, par unité de temps, un pourcentage constant de la radioactivité intracellulaire, marquant le RNA viral, est incorporé dans les virions sortant de la cellule.

d) Tous les phénomènes aboutissant à la réplication et à l'encapsulation du RNA viral sont dépendants du métabolisme cellulaire, plus exactement du bon fonctionnement et de l'activité répllicative normale des cellules. Nos résultats démontrent clairement - et ce point nous paraît important - que la synthèse de virions diminue notablement lorsque l'activité mitotique des cellules est bloquée soit par un milieu dépourvu de sérum, soit par l'inhibition de contact qui se produit lorsque la monocouche cellulaire est dense et complète. Ainsi se trouve confirmé, pour la lignée JLS V5, un fait suggéré par les observations des virologues, à savoir qu'il s'agit d'un système où les relations cellules-virus sont du type équilibré (Steady-State) ce qui implique une relation entre multiplication cellulaire et production virale.

e) La réplication du RNA viral est sensible à l'action de l'actinomycine D, puisque si cette réplication est encore possible en présence de $0,1 \times$ de l'antibiotique, la synthèse du RNA diminue nettement pour $0,3$ et $0,5 \times$ /ml et disparaît complètement pour $5 \times$ /ml. Cette sensibilité à l'actinomycine, que nos résultats démontrent, ne permet pas d'étudier la réplication du RNA viral en bloquant tous les RNA cellulaires, comme cela est possible dans le cas des petits virus RNA, type poliomyélite. Elle pose par ailleurs le problème des modalités de réplication du RNA du virus de Rauscher, problème encore non résolu, comme nous allons le voir.

Il est évident que le virus de Rauscher, et les autres virus leucémogènes murins ou aviaires - se singularisent par une molécule de RNA extrêmement volumineuse. Comment se réplique ce RNA monocaténaire de haut poids moléculaire ?

Dans l'état actuel de nos connaissances, la répllication d'une fibre de RNA viral ne peut se faire que sur une matrice (template) sur lequel travaille un enzyme répliquant. En théorie, cette matrice peut être DNA ou RNA.

Puisqu'une matrice RNA double-brin (formes intermédiaires et formes réplcatives) associée à une RNA polymérase - RNA dépendante (réplicase) viro-induite et spécifique, a été démontrée comme l'outil de répllication de tous les RNA viraux connus jusqu'ici, il était logique de suspecter que la répllication du RNA du virus de Rauscher suivrait le même modèle. Malheureusement, il n'a pas été possible, dans notre laboratoire et dans plusieurs laboratoires étrangers, de mettre en évidence, dans les cellules infectées par le virus de Rauscher, de structures double-brins (formes réplcatives et formes intermédiaires), de brins (-) complémentaires, et de réplcasse spécifique. De telles constatations négatives n'infirmement évidemment pas l'hypothèse selon laquelle le RNA du virus de Rauscher se répliquerait comme les autres RNA viraux. Les échecs peuvent être dûs en effet, à des conditions techniques ; par exemple, l'impossibilité de mettre en évidence une forme réplcative pouvant s'expliquer par le fait que cette forme peut être en très faible quantité, ou qu'elle est liée à des structures membranaires qui rendent son extraction difficile, etc...

Il est cependant une autre particularité de la répllication du virus de Rauscher qui mérite attention : c'est sa sensibilité à l'actinomycine. On sait que le système répliquant le RNA viral n'est pas sensible à l'actinomycine D dans le cas des petits et moyens virus RNA. Cette non-sensibilité fournit d'ailleurs la base de l'extraction différentielle du RNA viral par rapport aux RNA

cellulaires, puisque ceux-ci y sont sensibles. Il semble toutefois que, plus complexe est le virus, plus complexe est le mécanisme de répllication, et plus grande est la dépendance de ce mécanisme vis à vis d'événements dépendants du génome cellulaire. Dans le cas des myxovirus par exemple, dans le cas du virus du sarcome de Rous, les phases précoces de la répllication du RNA viral sont dépendantes d'événements cellulaires successifs, qui eux sont sensibles à l'action de l'actinomycine D. Plus tardivement dans le cycle de répllication, ces phénomènes ne sont plus nécessaires, et l'action de l'actinomycine devient nulle sur la répllication des virus.

Le système que nous avons étudié - cellules chroniquement infectées par le virus de Rauscher - réalise cependant un cas très particulier et non assimilable aux modèles précédemment décrits. Dans ce système chroniquement infecté, tous les événements liés à la biosynthèse du RNA viral sont présents à chaque instant puisque les cellules ne sont pas synchronisées. L'actinomycine agissant instantanément et constamment, on est conduit à penser que c'est la répllication du RNA viral lui-même qui est sensible à l'actinomycine D.

Comment expliquer l'action de l'actinomycine D dans ce système ? - On peut d'abord supposer que la répllication du RNA viral est dépendante, pendant toute la durée du cycle, d'un événement répétitif ou d'événements différents dépendants du génome cellulaire.

- On peut également supposer que l'antibiotique agit directement sur la forme répllicative hypothétique, par exemple du fait d'une séquence nucléotidique particulière au RNA du virus de Rauscher.

- Enfin, puisque l'effet le plus connu de l'actinomycine D est de bloquer la synthèse de RNA DNA-dépendants, on pourrait penser que la répllication du virus de Rauscher se fait par l'intermédiaire d'un précurseur DNA. Par exemple, la forme virale (-) pourrait être couplée avec - ou même incorporée dans - le DNA cellulaire.

La démonstration apportée par Harel, Lacour et Huppert (1966, 1967) d'une part, Mme Emanoil-Ravicovitch et Larsen (1969) dans notre laboratoire d'autre part, qu'il existe une certaine homologie de séquences entre le RNA du virus de Rauscher et le DNA des cellules hôtes, homologie mise en évidence par les techniques d'hybridation, invite certainement à étudier de plus près les rapports que pourrait contracter le RNA viral avec le DNA cellulaire.

Pour conclure cette discussion, les résultats, apportés dans cette Thèse, soulignent l'importance et l'originalité de l'action de l'actinomycine D sur la réplication du RNA du virus de Rauscher. Mais ils ne permettent pas encore de préciser les modalités selon lesquelles cette réplication s'effectue. D'autres travaux - portant notamment sur la structure du RNA viral - seront nécessaires avant que cet important problème de biochimie virale soit résolu.

CONCLUSIONS

L'acide ribonucléique du virus leucémogène murin de Rauscher et les modalités de sa biosynthèse ont été étudiés dans une lignée cellulaire (JLS V5) chroniquement infectée par ce virus.

Les résultats suivants ont été obtenus :

a) Le RNA viral est une molécule monochaine de haut poids moléculaire (et de sédimentation 70 S ; $FM \sim 10^7$ daltons).

b) L'incorporation de précurseurs (^{32}P et 3H -uridine) dans le RNA des virions sortant de la cellule permet de montrer que

- les premières molécules marquées apparaissent de 1 h 30 à 5 h après un marquage court.
- Le processus suit une fonction exponentielle.

- La sortie des premières molécules dépend de la nature du support sur lequel croissent les cellules, rapide dans le cas du plastique, plus lente dans le cas du verre.

- Aucune sortie n'est observée lorsque les cellules sont bloquées dans leur cycle mitotique, soit par le phénomène d'inhibition de contact dans une monocouche cellulaire complète, soit par la déprivation du milieu de culture en sérum. La production virale par les cellules dépend donc d'une activité mitotique normale.

c) La recherche directe du RNA viral dans les cellules JLS V5 par extraction après marquages (longs ou courts), suivis ou non de chasse, en présence ou en l'absence d'actinomycine D montre que :

1) Il est possible d'extraire le RNA viral 70 S de la cellule JLS V5. Il semble que ce RNA soit d'abord présent dans la fraction nucléolaire, puis qu'il migre dans le cytoplasme.

2) L'actinomycine D, à partir de la concentration 0,3 μ /ml diminue puis bloque la biosynthèse du RNA viral dans la cellule.

3) Les modalités précises de réplication de ce RNA sont encore inconnues. La sensibilité à l'actinomycine D, pendant toute la durée du cycle de biosynthèse, est toutefois un phénomène très spécial qui différencie la réplication du virus de Rauscher de celle des autres virus connus - et qui attire l'attention sur les interrelations possibles entre le RNA viral et le DNA cellulaire.

BIBLIOGRAPHIE

- . ATTARDI, G., PARNAS, H., HWANG, M. et ATTARDI, B. (1966), J. Mol. Biol., 20, p. 145
- . BEHERENS, M. (1939), Hope Syler's Physiol. Chem., 258, p. 27
- . BERNARD, C., SILVESTRE, D., TANZER, J., PERIES, J. et BOIRON, M. (1965), Exp. Cell Res., 40, p. 513
- . BRAKKE, M.K. (1951), J. Amer. Chem. Soc., 73, p. 1847
- . BRAKKE, M.K. (1953), Arch. Biochem. Biophys., 45, p. 275
- . BRAY, A.G. (1960), Analytical Biochem., 1, p. 279
- . BRENER, S. et HORNE, R.W. (1959), Biochem. Biophys. Acta, 34, p. 103
- . BRITTEN, R. et ROBERTS, R.B. (1960), Sciences, 131, p. 32
- . CHENAILLE, Ph. (1968) Thèse de Sciences
- . DUESBERG, P.H. et ROBINSON, W.S. (1966), Proc. Nat. Acad. Sci., 55, p. 219
- . DE DUNE (1959), Progress in Biophysics and Biophysical Chemistry, vol. 9, Pergamon Press, New-York
- . EMANOIL-RAVICOVITCH, R., LARSEN, C.J. et BOIRON, M. (1969) C.R. Acad. Sci., 268, p. 1137
- . EMANOIL-RAVICOVITCH, R. et Col. (1969), sous presse
- . FLECK, A. et MUNRO, H.N. (1962), Biochem. Biophys. Acta, 55, p. 571
- . FRIEND, C. (1957), J. Exp. Med., 105, p. 307
- . GALIBERT, F., BERNARD, C., CHENAILLE, Ph. et BOIRON, M. (1965) Nature, 209, p. 680
- . GALIBERT, F., BERNARD, C., CHENAILLE, Ph. et BOIRON, M. (1965) C.R. Acad. Sci., 261, p. 1771
- . GIERER, A. et SCHRAMM, G. (1956), Nature, 177, p. 702
- . GRAFFI, A. (1960), Progr. Exp. Tumor Res., 1, p. 112

- . GROSS, L. (1951), Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 76, p. 27
- . GROSS, L., DREYFUSS, Y. et MOORE, L.A., (1961), Proc. Amer. Assoc. Cancer Res., 3, p. 231
- . HAMPE, A., GALIBERT, F., PERAUDEAU, L. et BOIRON, M. (1968), C.R. Acad. Sci. (Paris), 267, p. 908
- . HAREL, J., HAREL, L., LACOUR, F. et HUPPERT, J. (1966), C.R. Acad. Sci. (Paris), 263, p. 616
- . HAREL, J., HAREL, L. et HUPPERT, J. (1967), Biophys. Biochim. Res. Comm., 28, p. 44
- . HIATT, H.H. (1962), J. Mol. Biol., 5, p. 217
- . HUTCHINSON, W.C. et MUNRO, H.N. (1961), Analyst., 86, p. 768
- . JARRETT, W.F.H. (1967), III^e Symposium International des Leucémies Comparées - Paris
- . KATZ, S. et COMB, D.E. (1963), J. Biol. Chem., 238, p. 3065
- . LEVY, J.P., SILVESTRE, D., LECLERC, J.C. et BOIRON, M. (1966), Virology, 29, p. 681
- . LINDERSTROM-LANG, K. (1937), Nature, 139, p. 713
- . LITTAUER, U.Z. et EISENBERG, A. (1959), Biochem. Biophys. Acta, 32, p. 320
- . MANAKER, R.A., STROTHER, P.C., MILLER, A.A. et PICZAK, C.V. (1960), J. Nat. Cancer Inst., 25, p. 1411
- . MANAKER, R.A., JENSEN, E.M. et KOROL, W. (1964), J. Nat. Cancer Inst., 33, p. 363
- . MARCOT-QUEIROZ, J. et MONIER, R. (1965), J. Mol. Biol., 14, p. 490
- . MARTIN, R.G. et AMES, B.N. (1961), J. of Biol. Chem., 236, p. 1372
- . MOLONEY, J.B. (1960), J. Nat. Cancer Inst., 24, p. 933
- . MOLONEY, J.B. (1962), Fed. Proc., 21, p. 19
- . MOORE, A.E. et FRIEND, C. (1958), Proc. Amer. Assoc. Cancer Res., 2, p. 328
- . MORA, P.T. et McFARLAND, W.W. (1965), Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash), 54, p. 756

- . PENMAN, S. (1966), J. Mol. Biol., 17, p. 117
- . PERIES, J., LEVY, J.P., BOIRON, M. et BERNARD, J. (1964), Nature 203, p. 672
- . RAUSCHER, R.J. (1962), J. Nat. Cancer Inst., 29, p. 515
- . SCHACHMAN, K.H. (1959), Ultracentrifugation in biochemistry, Academic Press - New-York
- . SCHERRER, K. et DARNELL, J.E. (1962), Bioch. Biophys. Res. Comm., 7, p. 486
- . SCHWARTZ, S.O., SCHOOLMAN, H.M. et SZANTO, P.B. (1955), J. Lab. Clin. Med., 46, p. 949
- . SILVESTRE, D., LEVY, J.P., BERNARD, C. et BOIRON, M. (1965) J. Microscopie, 4, p. 705
- . WARNER, J.R., SOEIRO, R., BIRNBOIM, H.C., GIRARD, M. et DARNELL, J.E. (1966), J. Mol. Biol., 19, p. 349
- . WRIGHT, B.S. et LASFARGUES, J.C. (1964), Proc. Amer. Assoc. Cancer Res., 5, p. 70
- . WRIGHT, B.S. et LASFARGUES, J.C. (1965), J. Nat. Cancer Inst., 35, p. 319.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Les besoins quantitatifs en asparagine des cellules normales et cancéreuses :
mécanisme d'action de l'asparaginase.

Vu et approuvé

Paris, le 26 Juin 1969

Le Doyen de la Faculté des Sciences
de Paris

Marc ZAMANSKY

Vu
et permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris

Jean ROCHE

